ISOLIERUNG UND STRUKTUR DES TETRACYCLISCHEN POLYPEPTIDANTIBIOTIKUMS EPIDERMIN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hermann Allgaier
aus Göppingen

1985

ISOLIERUNG UND STRUKTUR DES TETRACYCLISCHEN POLYPEPTIDANTIBIOTIKUMS EPIDERMIN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hermann Allgaier
aus Göppingen

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	6. Mai 1985
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

MEINER FAMILIE

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Jung in der Zeit von März 1983 bis März 1985 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Jung danke ich herzlich für die Themenstellung, für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und für viele wertvolle Anregungen.

Herrn Prof. Dr. E. Bayer danke ich für die Überlassung von Institutseinrichtungen.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit durch ein Promotionsstipendium.

Die Fa. Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riss, unterstützte diese Arbeit in dankenswerter Weise. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Priv. -Doz. Dr. R. G. Werner.

Die Produktion des Antibiotikums sowie die Optimierung der Nährmedien wurde gleichzeitig am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zähner von Frau U. Schneider und Herrn T. Hörner durchgeführt. Ihnen gilt mein Dank für die Bereitstellung des Rohprodukts sowie für das freundliche, interdisziplinäre Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1.	Pathogenese der Akne	1
1.2.	Therapie	2
1.3.	Problemstellung	3
2.	ISOLIERUNG UND REINIGUNG	5
2.1.	Fermentation	5
2.2.	Anreicherung aus dem Kulturmedium	5
2.3.	Vorversuche zur Reinigung	6
2.4.	Isolierung	7
2.5.	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	10
3.	CHARAKTERISIERUNG VON EPIDERMIN	12
3.1.	Aminosäurenzusammensetzung	12
3.1.1.	Proteinaminosäuren	12
3.1.2.	Lanthionin und 3-Methyllanthionin	14
3.1.3.	Konfiguration und Anzahl der Lanthionin- und 3-Methyllanthioninreste	21
3.1.4.	Dehydroaminobuttersäure	27
3.1.5.	Weitere Bausteine von Epidermin	29
4.	SEQUENZIERUNG VON EPIDERMIN	30
4.1.	Strategie	30
4.2.	Vorversuche zur selektiven Fragmentierung	31
4.3.	Enzymatische Spaltungen	32

4.4.	Charakterisierung der tryptischen Fragmente P1 und P2 bzw. P2'	36
5.	SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN EPIDERMIN SOWIE SEINEN TRYPTISCHEN FRAGMENTEN P1 UND P2	39
5.1.	^{13}C-Kernresonanzspektroskopie	39
5.2.	^{1}H-Kernresonanzspektroskopie	46
5.3.	UV-Spektroskopie	49
5.4.	IR-Spektroskopie	49
5.5.	FD- und FAB-Massenspektrometrie	53
6.	STRUKTURAUFKLÄRUNG VON FRAGMENT P1	56
6.1.	Strategie	56
6.2.	Desulfurierung-Wahl des geeigneten Katalysators	58
6.3.	Umsetzung von P1 mit Carboxypeptidase B	60
6.4.	Entschwefelung von P12	62
6.5.	FAB-Massenspektren der entschwefelten Fragmente-Ableitung der Sequenz	65
6.6.	EDMAN-Abbau des Dodekapeptids	68
6.7.	Zuordnung der Schwefelbrücken-Struktur von P1	70
6.8.	Enzymatische Spaltung von P12 mit Endoproteinase Lys-C	73
6.9.	Schematische Zusammenfassung der Strukturaufklärung von P1	74

7.	STRUKTUR DES TRYPTISCHEN FRAGMENTS P2	76
7.1.	Strategie	76
7.2.	Umsetzung von P2 mit Raney-Nickel	77
7.3.	Enzymatische Spaltungen der Peptide P21 und P22	82
7.4.	Struktur des α-chymotryptischen Spaltproduktes L-Ala^{21}-R	84
7.5.	Hydrierung von Epidermin und Nachweis von 4-Thialysin	87
7.6.	Sequenzierung des Peptids P21	93
7.6.1.	Strategie	93
7.6.2.	Acidolytische Fragmentierung des Peptids P21	95
7.7.	Zuordnung der Thioetherbrücken im tryptischen Fragment P2	100
7.8.	Differenzierung zwischen Asparagin und Asparaginsäure	103
7.9.	Schematische Zusammenfassung der Strukturaufklärung von P2	105
7.10.	Die Primärstruktur von Epidermin	105
8.	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE UND CIRCULARDICHROISMUS	108
8.1.	^{13}C-Kernresonanz	108
8.2.	Konfiguration der in Epidermin vorhandenen Doppelbindungen	116
8.3.	Circulardichroismus	117
8.3.1.	Optisch aktive Übergänge von Thiolen und Sulfiden	117

8.3.2.	CD-Spektren Schwefel enthaltender, heterodet cyclischer Peptide	118
8.3.2.1.	Chiroptische Eigenschaften von Nisin	118
8.3.2.2.	CD-Spektren von Epidermin	121
9.	BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN SCHWEFELHALTIGER, HETERODET CYCLISCHER PEPTIDE	125
9.1.	Biologische Charakterisierung von Nisin und Subtilin	125
9.2.	Biologische Charakterisierung von Epidermin	126
9.2.1.	Wirkungsspektrum im Vergleich zu Nisin, Erythromycin und Fusidinsäure	126
9.2.3.	Lymphozyten-Proliferation	129
10.	BIOSYNTHESE PEPTIDISCHER WIRKSTOFFE	130
10.1.	Einleitung	130
10.2.	Biosynthese Lanthionin- und 3-Methyllanthionin-haltiger Antibiotika	131
10.3.	Ableitung von Teilsequenzen der Precursorproteine aus den Strukturen der nativen Antibiotika	133
10.4.	Strategien zur Suche nach Vorläufersequenzen von Epidermin	136
10.5.	Isolierung einer Proteinfraktion mit einer dem Vorläufer ähnlichen Aminosäurenzusammensetzung	142

11.	EXPERIMENTELLER TEIL	144
11.1.	Chemikalien und Methoden	144
11.2.	Isolierung von Epidermin	150
11.3.	Nachweis von Lanthionin, 3-Methyllanthionin und 2-Ketobuttersäure	153
11.4.	Dansylierung von Epidermin	154
11.5.	Analytische Spaltungen des Antibiotikums	155
11.6.	Präparative Spaltung von Epidermin mit Trypsin	156
11.7.	Strukturaufklärung des tryptischen Fragments P1	158
11.7.1.	Spaltung von P1 mit Carboxypeptidase B	158
11.7.2.	Enzymatische Spaltungen des Peptids P12	160
11.7.3.	EDMAN-Abbau am Peptid P12	161
11.7.4.	Entschwefelung von P12	162
11.7.5.	Tryptische Spaltung des Dodekapeptids 1-12	164
11.7.6.	EDMAN-Abbau am entschwefelten Dodekapeptid	166
11.8.	Strukturaufklärung des tryptischen Fragments P2	172
11.8.1.	Umsetzung von P2 mit Raney-Nickel W-2	172
11.8.2.	Enzymatische Spaltungen am Fragment P21	173
11.8.3.	Präparative Spaltungen von P21 und P22 mit α-Chymotrypsin	174
11.8.4.	Abspaltung von Tyrosin aus P21(14-20)	176
11.8.5.	Hydrierung von Epidermin	176
11.8.6.	Oxidation von H3 mit Peroxyameisensäure	178
11.8.7.	Versuch der oxidativen Abspaltung des Pyruvylrestes aus P21(14-20)	178
11.8.8.	Acidolysen von P2, P21 und P22	179

11.8.9.	Endgruppenbestimmung am Dipeptid 16-17 und Tripeptid 15-17	180
11.9.	Synthesen	181
11.10.	Isolierung einer Proteinfraktion mit einer dem Vorläufer ähnlichen Aminosäurenzusammensetzung	183
12.	ZUSAMMENFASSUNG	186
13.	LITERATURVERZEICHNIS	189

ABKÜRZUNGEN

Ungewöhnliche Aminosäuren

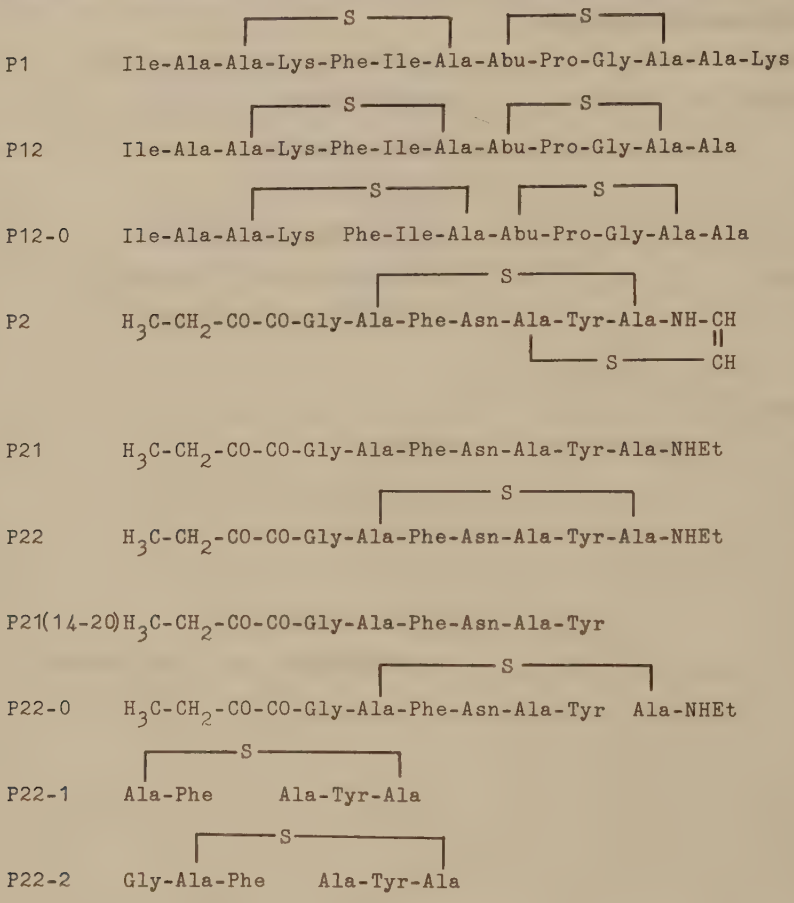
Abu-S-Ala	2S,3S,6R-3-Methyllanthionin
Ala-S-Ala	meso-Lanthionin
Dha	Dehydroalanin
Dhb	Dehydrobutyrin
Lan	meso-Lanthionin
3-Me-Lan	2S,3S,6R-3-Methyllanthionin
V-Cys	S-(2-Aminovinyl)-D-cystein

Chemikalien

BuOH	Butanol
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
MeOH	Methanol
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Die Abkürzungen für die Aminosäuren und deren Schutzgruppen entsprechen den IUPAC-IUB-Regeln (Eur. J. Biochem. 27, 201 (1972), 74, 1 (1977) und 138, 9 (1984)).

Wichtige Fragmente von Epidermin wurden wie folgt abgekürzt:



1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

" No one knows how to cure acne. The goal is to keep the flame low until the fire goes out spontaneously and especially to controll the conflagrations that leave scars."

PLEWIG, KLIGMAN "ACNE"

1.1. Pathogenese der Akne

Anatomisch handelt es sich bei Akne um eine Erkrankung der Talgdrüsenfollikel, welche im Gesicht, Schultergürtel, Brust- und Rückenbereich besonders zahlreich sind (1).
Die primäre Schädigung der Talgdrüse ist der Komedo, eine Mischung aus Talg und Mikroorganismen, dessen spätes Stadium als "Blackhead" auch mit dem bloßen Auge erkannt werden kann. Freie Fettsäuren im Talg sowie die Stoffwechselprodukte der im Follikel vorhandenen Anaerobier diffundieren in das umliegende Hautbindegewebe und verursachen eine zunächst noch sterile Entzündung. Durch Sekundärinfektionen mit pathogenen Keimen entstehen Akne-pusteln und Akneabszesse; ihre Abheilung erfolgt unter Narbenbildung.
Schweregrad und Verlauf der Erkrankung werden durch mehrere Faktoren beeinflußt, deren Summe ihrer individuellen Stärke in eine direkte Beziehung zum Krankheitsbild gesetzt werden kann (2-4).

Die Disposition zur Akne ist erblich, da Größe und Produktionsleistung der Talgdrüsen durch genetische Faktoren kontrolliert werden.
Weitere, die Talgdrüsenproduktion beeinflußende Faktoren sind hormonell bedingt, da die Talgdrüsenleistung durch Androgene stimuliert wird. Östrogene sowie Antiandrogene hemmen die Produktion. Kastraten erkranken nicht an Akne.
Abgesehen von Sekundärinfektionen durch pathogene Keime konnte bisher nur ein Mikroorganismus, Propionibacterium acnes, in einen kausalen Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht werden. Dieser strikte Anaerobier produziert eine Reihe von Toxinen und Exoenzymen, die im umliegenden Gewebe eine Immunantwort (Entzündung) auslösen.

1.2. Therapie

Die Behandlung sollte auf die Beseitigung oder zumindest Abschwächung ursächlich relevanter Faktoren abzielen. Die Variabilität des Krankheitsbildes erfordert eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Angriffspunkten.
Als externe Schälmittel zur Eliminierung bestehender und Verhinderung neuer Komedonen werden die all-trans-Retinsäure (Vitamin-A-Säure, Tretinoin) und Benzoylperoxid eingesetzt (5). Benzoylperoxid besitzt eine geringere Schälwirkung als Tretinoin, weist jedoch bakteriostatische Eigenschaften auf (1).
Östrogene sowie Antiandrogene zur Reduktion der Talgdrüsenproduktion werden topisch und systemisch bei Frauen eingesetzt.

Bei Männern ist diese Therapieform aus verständlichen Gründen kontraindiziert (6).

Das 13-cis-Isomer von Tretinoin, Isotretinoin (13-cis-Retinsäure), vermindert bei systemischer Anwendung die Talgproduktion beträchtlich. Bei den schweren Akneformen wie Akne conglobata brachte die Einführung von Isotretinoin dramatische Erfolge, diese müssen jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen erkauft werden (7).

Oral applizierte Antibiotika wie Tetracycline und Erythromycin besitzen neben ihrer antibakteriellen Aktivität auch eine entzündungshemmende Wirkung. Ihre geringe Toxizität läßt eine Langzeittherapie zu (8,9).

Topisch angewandte Antibiotika wie Erythromycin und Clindamycin (10,11) richten sich in erster Linie gegen Propionibacterium acnes. Sie sind nur dann wirksam, wenn sie in den Follikelkanal der befallenen Talgdrüsen diffundieren; ein Maß für diese Fähigkeit stellt ihre Lipophilie dar.

1.3. Problemstellung

Bei der Suche nach neuen, therapeutisch wirksamen Grundstrukturen durch die Fa. Dr. Karl Thomae GmbH konnte der Produzent eines Antibiotikums gegen grampositive Keime isoliert werden. Der Stamm Staphylococcus epidermidis Tü 3298 produziert einen Wirkstoff mit niedrigen MHK-Werten gegen Propionibacterium acnes sowie gegen die bei Akneerkrankungen für Sekundär- und Superinfektionen

verantwortlichen Staphylokokken und Streptokokken. Dieser antibiotische Wirkstoff wurde als Epidermin bezeichnet.
Ziel dieser Arbeit war die Ausarbeitung eines effizienten Isolierungsverfahrens für größere Mengen Epidermin zu klinischen Studien sowie die Strukturaufklärung dieses therapeutisch interessanten Naturstoffs.

2. ISOLIERUNG UND REINIGUNG

2.1. Fermentation

Die Zucht des Produzenten Staphylococcus epidermidis Tü 3298 erfolgt aerobisch bei 37 °C in einem Komplexmedium der Zusammensetzung Fleischextrakt (3 %), Malzextrakt (2 %) und $CaCO_3$ bzw. $Ca(OH)_2$ (50 mMol). Das Maximum an antibiotischer Aktivität wird nach 18-23 h erreicht. Trotz zahlreicher Versuche zur Medienoptimierung konnte von SCHNEIDER (12) und HÖRNER (13) kein Minimalmedium gefunden werden, so daß bei der anschließenden Aufarbeitung mit einer Fülle polarer Begleitstoffe aus dem Fermentationsmedium gerechnet werden mußte.

2.2. Anreicherung aus dem Kulturmedium

Klassische Verfahren zur Anreicherung von Naturstoffen aus Kulturfiltraten sind Adsorbtion an Aktivkohle, Extraktion oder Fällung der gewünschten Komponenten (14). Die Gefriertrocknung des gesamten Kulturfiltrats ist vor einer chromatographischen Aufarbeitung oft sinnvoll.
Erste Versuche zur Anreicherung des Antibiotikums wurden am Kulturfiltrat von 10 l-Fermentern vorgenommen, wobei die Effektivität einzelner Schritte durch den Plattendiffusionstest (15) überprüft wurde. Die aktive Komponente konnte aus dem von Zellen und Kalk befreiten Kulturfiltrat durch Extraktion mit 1-Butanol angereichert werden. Diese Extraktion gelang aber nur beim natürlichen End-pH des Kulturfiltrats von 8.0, aus sauren Medien ließ

sich das Antibiotikum nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahieren.
Eine weitere Reinigung konnte durch die Abtrennung lipidischer Begleitstoffe durch Etherfällung erreicht werden. Dazu wurde der Butanolextrakt eingedampft, der Rückstand in Methanol gelöst und in kalten Diethylether eingerührt. Epidermin blieb dabei vollständig im ausgefällten Material zurück (Schema 1).
Etwas günstiger als diese extraktive Anreicherung erwies sich die zu einem späteren Zeitpunkt eingeführte Adsorption des zentrifugierten Kulturfiltrats an Amberlite XAD-8, einem Polymeren auf Acrylesterbasis (Serva, Heidelberg). Diese Methode empfahl sich insbesondere zur Aufarbeitung größerer Mengen an Kulturfiltrat. Die Anheftung von Epidermin erfolgte dabei nicht durch einfache Adsorption, sondern durch die Kationenaustauschwirkung freier Acrylsäuregruppierungen am Harz. Dafür sprach die Tatsache, daß die aktive Komponente nur durch Elution mit Methanol/konz. HCl (99:1) vom Harz gelöst werden konnte. Das stark saure Eluat mußte vor dem Einengen mit Ammoniak neutralisiert werden, so daß im Rückstand beträchtliche Mengen an Ammoniumchlorid vorhanden waren. Auf ein anschließendes Umfällen aus Methanol/Ether konnte nach Aufarbeitung durch Adsorption an XAD-8 verzichtet werden.

2.3. Vorversuche zur Reinigung

Stabilitätstests und chromatographische Untersuchungen wurden mit dem eingedampften Butanolextrakt durchgeführt. Die Inkubation des Extraktes mit wässrigen Lösungen verschiedener pH-Werte

ergab ab pH 10 eine starke Abnahme der Aktivität, im Bereich von 2-7 ist das Antibiotikum jedoch stabil.

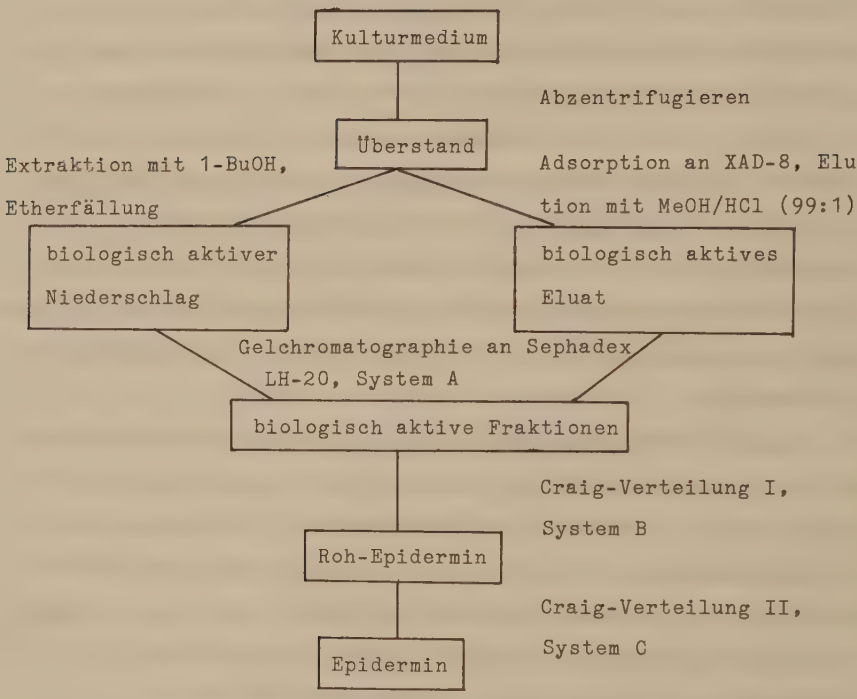
In den Dünnschichtchromatogrammen des eingeengten Butanolextraktes fanden sich eine Vielzahl mit verschiedenen Sprühreagentien (16) anfärbbarer Verbindungen. Parallel dazu durchgeführte Bioautogramme ergaben wichtige Hinweise auf die Natur der unbekannten Aktivität. In sauren und neutralen Systemen blieb das Antibiotikum bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel am Start, während die Chromatographie mit alkalischen Laufmitteln R_F-Werte zwischen 0.3 und 0.6 ergab. Die Kombination der Bioautographie mit der Dünnschichtchromatographie in alkalischen Systemen zeigte eine Korrelation mit einer Verbindung, welche durch Ninhydrin anfärbbar war.

Als Ergebnis dieser Vorversuche konnte festgehalten werden, daß es sich bei der unbekannten Aktivität um ein stark basisches Peptid handelte, welches sich einer weiteren Aufreinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 entzog, da es mit sauren oder neutralen Systemen nicht von der Säule eluiert werden konnte. Die Anwendung alkalischer Systeme verbot sich durch die Instabilität des Antibiotikums bei hohen pH-Werten.

2.4. Isolierung

Eine schonende und effektive Trennung von Naturstoffgemischen nach der Molekülgröße erhält man durch Säulenchromatographie an Dextrangelen wie Sephadex (Pharmacia, Freiburg). Die Anwesenheit saurer Funktionen in den Sephadex G-Typen verleiht den Gelen

Schema 1: Isolierung von Epidermin.



System A: Methanol/Eisessig (95:5)

System B: 1-Butanol/Essigester/0.1 N Essigsäure (3:1:3), 160 Stufen

System C: 2-Butanol/0.05 N Ammoniumacetat (1:1), 440 Stufen

Kationenaustauscheigenschaften (17), so daß bei der Chromatographie basischer Peptide mit erheblichen Wechselwirkungen zwischen Matrix und Probe gerechnet werden muß. Der durch Hydroxypropylierung aus Sephadex G-25 hergestellte LH-20 Typ besitzt dagegen keine Ionenaustauscheigenschaften.

Die Trennung des XAD-Eluats bzw. des von Lipiden befreiten Butanolextrakts an Sephadex LH-20 mit Methanol/Essigsäure (19:1) trennte eine große Zahl von kleinen Peptiden, Aminosäuren und Salzen aus dem Medium vom Antibiotikum ab (Schema 1).

Bei der sich anschließenden multiplikativen Verteilung nach CRAIG (18-20) konnten die bei der Extraktion des Antibiotikums aus dem Kulturfiltrat gemachten Erfahrungen herangezogen werden. In einer ersten Flüssig-Flüssig-Verteilung mit dem System 1-Butanol/ Essigester/0.1 N Essigsäure blieb das Antibiotikum am Start. Bei der zweiten Craig-Verteilung mit dem neutralen System 2-Butanol/ 0.05 N Ammoniumacetat fand sich das Antibiotikum in der Mitte der Apparatur. Somit konnten erst die lipophileren, dann polare Verunreinigungen und nichtflüchtige Salze entfernt werden. Ammoniumacetat konnte als flüchtiger Puffer durch Lyophilisation am Hochvakuum wieder vollständig entfernt werden. Eine verlustreichere Endreinigung an Sephadex G-10 wurde durch Erhöhung der Stufenzahlen der beiden Gegenstromverteilungen umgangen.

Epidermin fiel nach Gefriertrocknung als eine in allen verwendeten Dünnschichtsystemen einheitliche farblose Substanz an. Die chemische Detektion auf Dünnschichtplatten konnte mit folgenden Sprühreagentien durchgeführt werden: Ninhydrin (21), Chlor/TDM (22),

Orcin/Schwefelsäure (23) und Anisaldehyd/Schwefelsäure (24). Zerstörungsfrei ließ sich das lipophile Antibiotikum durch Besprühen mit Wasser sowie im UV-Licht bei 254 nm nachweisen. Der Versuch der Detektion mit Ellmans Reagens (25) verlief negativ.

2.5. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Die Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (26) zu analytischen und semipräparativen Trennungen erwies sich als äußerst fruchtbar bei der Sequenzierung und Strukturaufklärung des vorliegenden Antibiotikums. Ihre volle Aussagekraft erhält die HPLC aber nur bei sorgfältiger Optimierung der chromatographischen Bedingungen wie Säulenmaterial, Elutionspuffer, Flußrate und Detektion (27).

HPLC-Trennungen von Peptiden und Polypeptiden (28-30) werden heute fast ausschließlich an Umkehrphasen (RP 18) durchgeführt. Das als Trägermaterial verwendete Kieselgel muß dazu eine hohe Beladung mit organischer Phase aufweisen, da sonst Wechselwirkungen mit polaren basischen Peptiden auftreten, welche bis zur irreversiblen Adsorption führen können.

In Pilotversuchen mit Epidermin-Proben zeigten Säulenmaterialien der Firmen Waters (µ Bondapak C_{18}) und Macherey & Nagel (Nucleosil 7 C_{18}) die besten Trenneigenschaften (Abb. 1). Ungeeignete Phasen vergrößerten die Halbwertsbreite des Elutionspeaks bis um den Faktor 20.

Neben der Wahl des Säulenmaterials spielten auch die Zusammensetzung der bei der Gradientenelution verwendeten wässrigen Puffersysteme eine große Rolle. Es ergab sich eine Korrelation zwischen pH-Wert und Halbwertsbreite der Elutionsbande. Die besten Trennungen wurden bei Verwendung einer 0.1 proz. Trifluoressigsäurelösung erzielt, wobei zudem bei semipräparativen Aufarbeitungen die Proben nach Lyophilisation salzfrei anfielen. Der Nachteil stark saurer Puffersysteme lag in der dadurch drastisch verkürzten Lebensdauer der Säulenmaterialien.

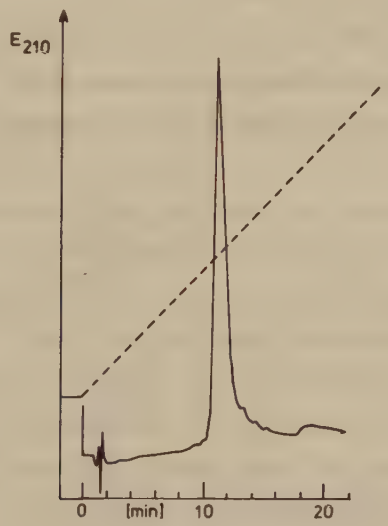


Abb. 1: HPLC-Chromatogramm von Epidermin (μ Bondapak C_{18}, 300 x 3.9 mm). Mobile Phase: A = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (10:90), B = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (70:30); linearer Gradient von 10 % B auf 70 % B in 30 min, 2.0 ml/min.

3. CHARAKTERISIERUNG VON EPIDERMIN

3.1. Aminosäurenzusammensetzung

3.1.1. Proteinaminosäuren

Die Totalhydrolyse von Epidermin (6 N HCl, 18 h, 110 °C) und quantitative Aminosäurenanalyse durch Ionenaustauscherchromatographie auf einem Biotronik LC 6000 E (Standardprogramm) lieferte folgende α-Aminosäurenzusammensetzung (Abb. 2):
Asp (1.00), Pro (0.95), Gly (2.09), Ala (2.03), Ile (2.03), Tyr (0.30), Phe (2.02), Lys (2.00).
Der niedrige, nichtstöchiometrische Tyrosinwert wurde zunächst als zu vernachlässigende Verunreinigung angesehen. Die Zugabe von Thioglycolsäure (31) erhöhte jedoch den Tyrosingehalt des Totalhydrolysats auf den weitgehend stöchiometrischen Wert von 0.93.

Die Konfiguration der Aminosäuren wurde durch Gaschromatographie der Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester ermittelt. Die Trennung erfolgte an der chiralen stationären Phase L-Valin-tert.-butylamid-polysiloxan (Chirasil-Val) (32,33). Durch Vergleich mit einer Testmischung von Aminosäuren bekannter Konfiguration konnte den oben angeführten Bausteinen die L-Konfiguration zugeordnet werden (Abb. 3). Somit enthält Epidermin einen für ein Peptidantibiotikum überraschend hohen Anteil an Proteinaminosäuren.

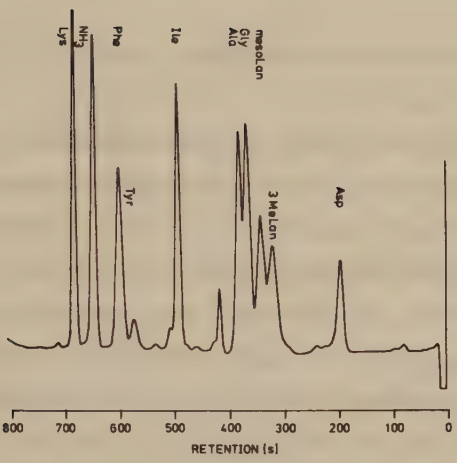


Abb. 2: Elutionschromatogramm des sauren Totalhydrolysats von Epidermin; Ninhydrin-Färbung, λ = 570 nm.

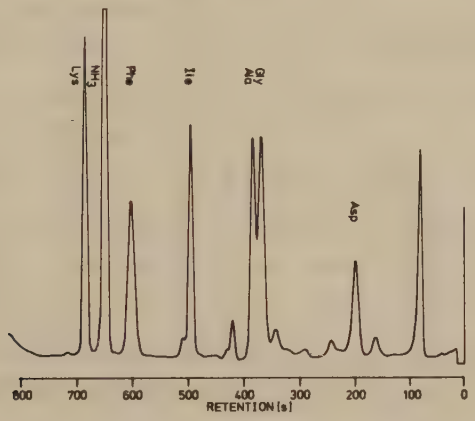


Abb. 4: Aminosäurenanalyse des mit Perameisensäure oxidierten Antibiotikums; Detektion mit Ninhydrin, λ = 570 nm.

3.1.2. Lanthionin und 3-Methyllanthionin

Im Elutionsprofil des sauren Totalhydrolysats von Epidermin auf dem Aminosäurenanalysator traten neben den Absorptionen der Proteinaminosäuren zwei weitere, sowohl bei 440 als auch bei 570 nm detektierbare Peaks auf, welche zwischen Prolin und Glycin erschienen (Abb. 2). Parallel dazu wurde bei der Gaschromatographie der durch Totalhydrolyse und Derivatisierung erhaltenen Pentafluoropropionylaminosäure-n-propylester an Chirasil-Val zwei zusätzliche Peaks im Bereich der schwerflüchtigen aromatischen oder basischen Aminosäuren erhalten (Abb. 3).

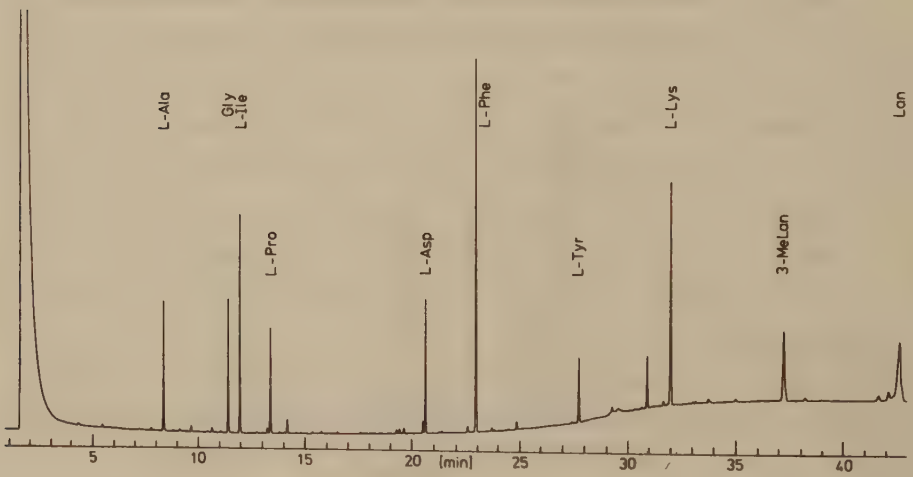


Abb. 3: Gaschromatogramm der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester des sauren Totalhydrolysats von Epidermin an Chirasil-Val. Temperaturprogramm 3 min 85 °C isotherm, dann 4 °C/min bis 200 °C; Trägergas H_2 (0.92 bar).

Bei der alkalischen Totalhydrolyse (34) wurden diese beiden Nichtproteinaminosäuren vollständig zerstört. Im sauren Totalhydrolysat des mit Perameisensäure oxidierten Antibiotikums (35) ließen sich diese Aminosäuren ebenfalls nicht mehr detektieren. Das Auftreten eines intensiven Peaks mit der Retention von Cysteinsäure ergab jedoch einen wichtigen Hinweis auf die schwefelhaltige Natur der beiden unbekannten Aminosäuren (Abb. 4).
Die Korrelation der unbekannten Peaks in der Aminosäurenanalyse und im Gaschromatogramm mußte durch zusätzliche Experimente abgesichert werden, da die Molmasse des Antibiotikums mit 2163 (vgl. Abschnitt 5.5.) im Vergleich zur Masse der identifizierten Proteinaminosäurereste eine Differenz von 757 Masseneinheiten aufwies. Bei einer durchschnittlichen Molmasse von 100 pro Aminosäurerest deutete dies auf sieben nicht identifizierte Aminosäuren bzw. andere Komponenten hin. Ferner mußte ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Peaks um nicht vollständig hydrolysierte Fragmente von Epidermin handelte.
Durch Dünnschichtchromatographie einer aus den identifizierten Proteinaminosäuren hergestellten Testmischung im Vergleich zum sauren Totalhydrolysat des Antibiotikums konnte mit dem Fließmittel Phenol/15 % wässrige Ameisensäure (3:1; g/g) ein System gefunden werden, daß die Abtrennung der beiden noch nicht bestimmten Aminosäuren ermöglichte. Die präparative Dünnschichtchromatographie gestattete die Reinisolierung der unbekannten Aminosäuren zur Durchführung folgender Experimente:

a) Die Korrelation zwischen Aminosäurenanalyse und Dünnschichtchromatographie wurde durch Injektion eines Teils der durch

präparative Dünnschichtchromatographie gewonnenen Probe in den Analysator getroffen. Dabei traten die beiden unbekannten Peaks im Chromatogramm wieder auf.

b) Die Koinjektion des derivatisierten Totalhydrolysats zusammen mit den beiden aus der Dünnschichtplatte isolierten derivatisierten Aminosäuren und gaschromatographische Trennung an Chirasil-Val ergab bei völlig symetrischer Peakform eine Zunahme der beiden letzten Peaks im Chromatogramm.

c) Die nochmalige Hydrolyse (6 N HCl, 18 h, 110 °C) der isolierten Fraktion ergab in der Aminosäurenanalyse wie bei der Dünnschichtchromatographie keine Veränderung.

Die gaschromatographischen Untersuchungen der beiden unbekannten Aminosäuren wurden mit der Aufnahme der jeweiligen Massenspektren gekoppelt. Abb. 5 und 6 zeigen die Massenspektren der als N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester derivatisierten Nichtproteinaminosäuren. Die höchsten m/e Werte 435 und 421 ließen vermuten, daß es sich bei den Verbindungen um Homologe handelte. Die Auswertung der Spektren mit Hilfe einer Spektrensammlung (36), in der unter anderem auch das Massenspektrum von Cystin vorhanden war, ergab, daß die schwefelhaltigen Aminosäuren Lanthionin und 3-Methyllanthionin im Antibiotikum enthalten waren.

Diese Bausteine sind auch Bestandteil der Peptidantibiotika Nisin (37,38) (Streptococcus lactis), Subtilin (39,40) (Bacillus subtilis), Cinnamycin (41) (Streptomyces cinnamoneus) und Duramycin (42) (Streptomyces cinnamoneus forma azacoluta), deren Strukturen durch die Arbeitsgruppe um GROSS et al. aufgeklärt wurden (Abb. 7).

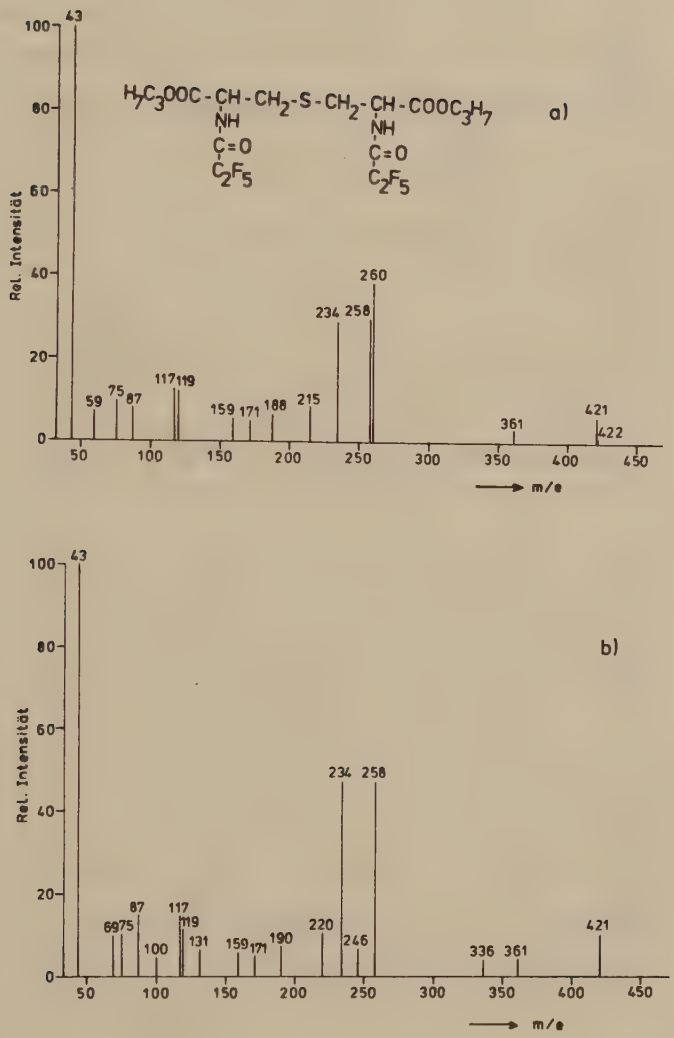


Abb. 5: EI-Massenspektren von a) isoliertem und b) synthetischem Lanthionin (n-Propyl/Pfp-Derivate).

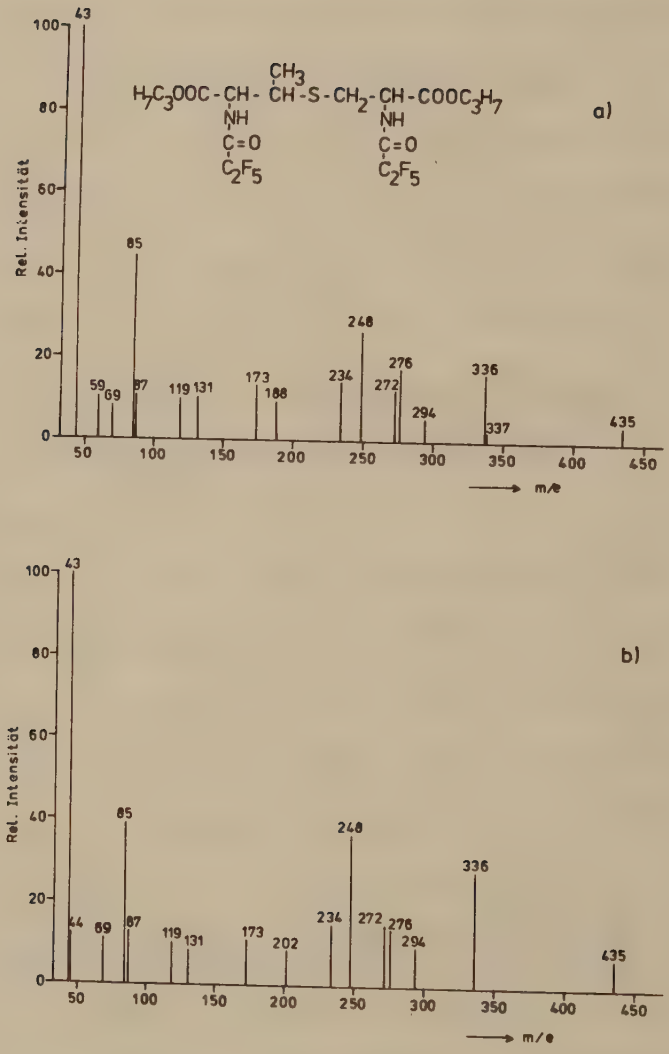
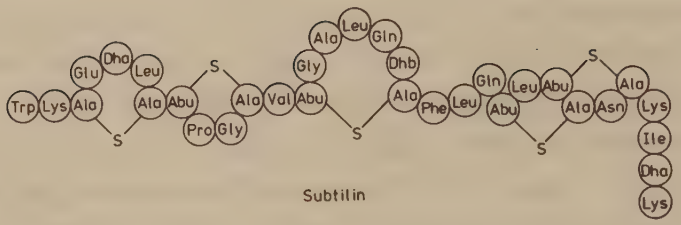


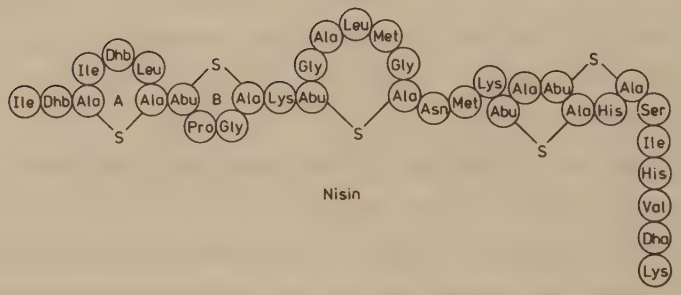
Abb. 6: EI-Massenspektren von a) isoliertem und b) synthetischem 3-Methyllanthionin (n-Propyl/Pfp-Derivate).

Nisin (aufgeklärt 1971) (43-45) und Subtilin (1973) (46-50) sind heterodete pentacyclische Polypeptide, deren Brücken durch die Schwefelatome eines Lanthioninrestes sowie von vier 3-Methyllanthioninresten gebildet werden. Beide Peptide enthalten nicht nur die gleiche Anzahl dieser schwefelhaltigen Aminosäuren, sondern auch die gleiche Zahl von Dehydroalanin (2) und Dehydrobutyrin (1) (38,51). Dehydroalanin und die Schwefel enthaltenden Ringe sind in Nisin und Subtilin jeweils an gleicher Sequenzposition zu finden, und beide Peptide besitzen das C-terminale Dipeptid Dehydroalanyl-lysin (52).

Cinnamycin (41) und Duramycin (42) enthalten neben Lanthionin und 3-Methyllanthionin als weitere verbrückende Aminosäure Lysinoalanin. Dehydroaminosäuren sind in diesen beiden Peptidantibiotika nicht enthalten, dafür aber mit erythro-Hydroxyasparaginsäure eine weitere Nichtproteinaminosäure. Beide Strukturen wurden von GROSS unter dem Vorbehalt der "Arbeitshypothese" veröffentlicht (53). Aufgrund seines tragischen Unfalls 1981 wurden keine endgültigen Strukturen publiziert.

Die Struktur eines weiteren heterodet cyclischen Polypeptidantibiotikums (AEI) mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Cinnamycin und Duramycin wird zur Zeit von SHIBA et al. aufgeklärt. Eine vorläufige Sequenz (persönliche Mitteilung) ist ebenfalls in Abb. 7 enthalten.





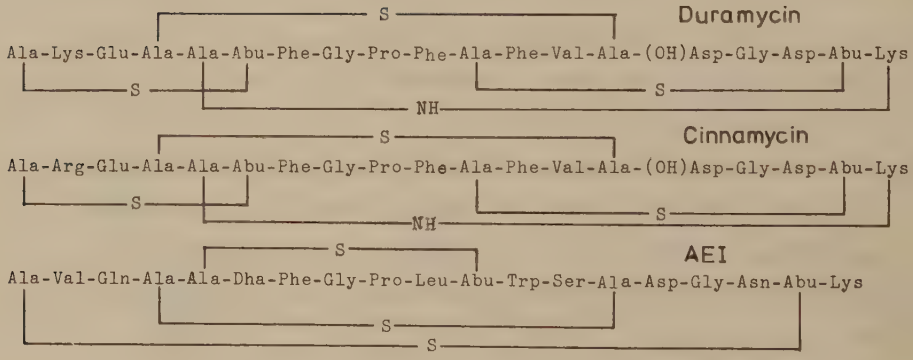


Abb. 7: Primärstrukturen heterodet cyclischer Polypeptidantibiotika.

3.1.3. Konfiguration und Anzahl der Lanthionin- und 3-Methyllanthioninreste

Lanthionin und 3-Methyllanthionin können in drei bzw. acht stereoisomeren Formen auftreten (Abb. 8). Die Konfiguration der α-C-Atome der Nichtproteinaminosäuren in Subtilin konnte schon 1953 nach Entschwefelung mit Raney-Nickel bestimmt werden (40). Diese

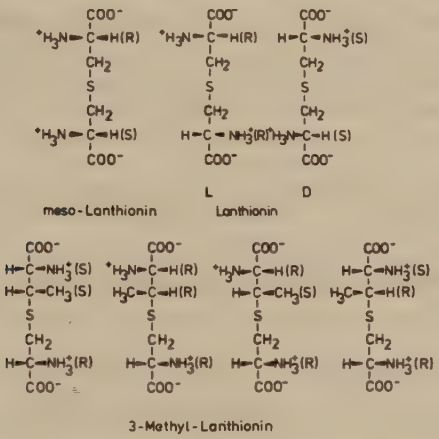


Abb. 8: Struktur und absolute Konfiguration der Stereoisomeren von Lanthionin und 3-Methyllanthionin.

Reaktion setzte aus Lanthionin D,L-Alanin frei, während 3-Methyllanthionin in L-Alanin und D-α-Aminobuttersäure zerfiel. Die Chiralität des β-Kohlenstoffatoms von 3-Methyllanthionin war nach Desulfurierung allerdings nicht mehr bestimmbar. Erst 1973 ließ sich durch Vergleich des nativen 3-Methyllanthionins mit synthetischen Produkten bekannter Stereochemie die L-Konfiguration

von C-3 festlegen (54). Später durchgeführte Röntgenstrukturanalysen (55,56) bestätigten die 2S,3S,6R-Konfiguration des nativen 3-Methyllanthionins in Subtilin.

An stereospezifischen Synthesen von threo-3-Methyl-D-cystein (57,58), der einen Hälfte von 3-Methyllanthionin, wird auch heute noch gearbeitet. Dessen Umsetzung mit N-Formyl-L-β-chloralanin führt zum nativen 2S,3S,6R-Isomeren (54).

Die Konfigurationsbestimmung der Thioetheraminosäuren in Epidermin wurde in Kooperation mit Dr. Ernst Küsters durch Gaschromatographie an chiraler stationärer Phase (Chirasil-Val) (33) durchgeführt.

Zu Vergleichszwecken wurden folgende Verbindungen synthetisiert (siehe Abb. 8):

2S,3S,6R-3-Methyllanthionin, 2R,3R,6R-3-Methyllanthionin

2R,3S,6R-3-Methyllanthionin, 2S,3R,6R-3-Methyllanthionin

D-Lanthionin, meso-Lanthionin, L-Lanthionin

Ferner stand eine kleine Menge an hochreinem Nisin von Erhard Gross zur Verfügung.

Obwohl die Trennung racemischer Aminosäuren an Chirasil-Val routinemäßig über die N-Pentafluoropropionyl-n-propylesterderivate erfolgt, verwendeten wir wegen der höheren Flüchtigkeit die Methylester (59). Abb. 9 zeigt eine Trennung der Stereoisomeren von Lanthionin. Die Elutionsfolge ist D vor L für α-Aminosäuren an chiralen L-Phasen. Die zu D- und L-Lanthionin diastereomere meso-Form erschien zwischen den Peaks beider Enantiomeren. Bei Cystin, welches sich von Lanthionin nur durch ein zusätzliches Schwefelatom in der Brücke unterscheidet (vgl. Abb. 8), können

zwar die Enantiomeren voneinander getrennt werden, nicht jedoch die meso- von der L-Form (60).

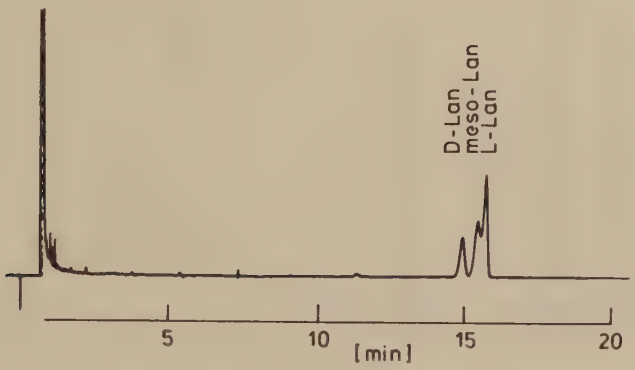


Abb. 9: Gaschromatographische Trennung der isomeren Lanthionine (PFP/Methylester) an Chirasil-Val. T = 170 °C isotherm, Trägergas H_2 (0.4 bar).

Die gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-methylester aus Epidermin ist in Abb. 10a wiedergegeben. Die Koinjektion des derivatisierten Totalhydrolysats zusammen mit meso-Lanthionin ergab ein Anwachsen des letzten Peaks (Abb. 10b). Analoge Ergebnisse wurden durch Koinjektion eines Totalhydrolysats von Nisin mit meso-Lanthionin erhalten (61).

Die Trennung der vier synthetisierten, diastereomeren 3-Methyllanthioninderivate innerhalb des normalen Temperaturprogramms an Chirasil-Val zeigt Abb. 11a. Die Koinjektion dieser Probe mit Epidermin (Abb. 11b) und Nisin (Abb. 11c) bewies die 2S,3S,6R-Konfiguration von 3-Methyllanthionin in Epidermin.

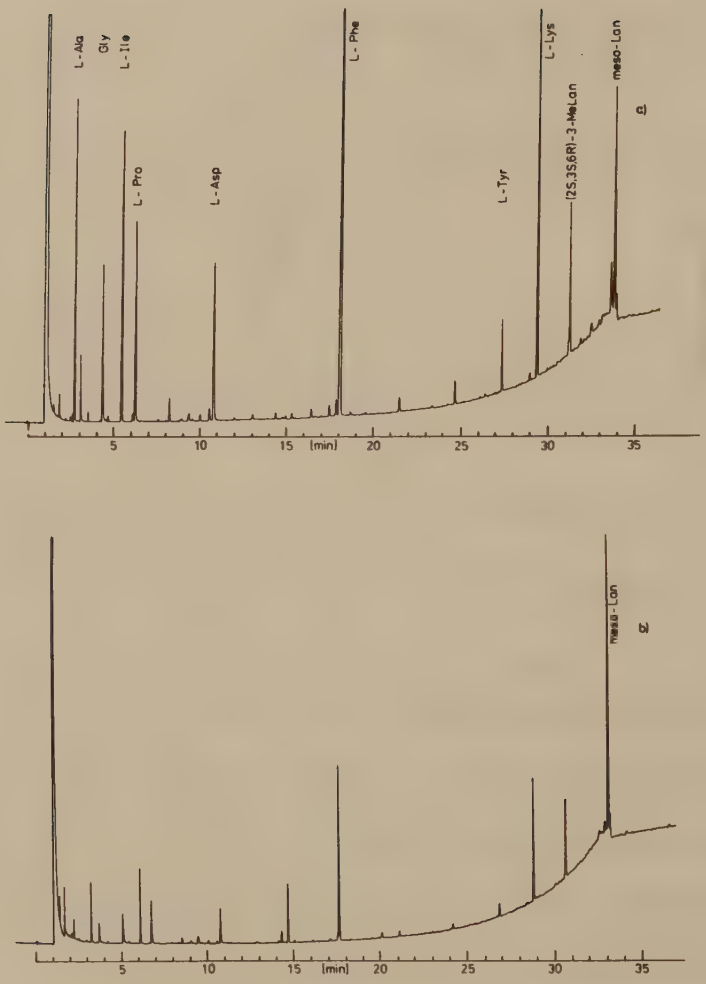


Abb. 10: a) Gaschromatographische Trennung des derivatisierten sauren Totalhydrolysats von Epidermin an Chirasil-Val (Pfp/Methylester). T = 80/3/4/200, Trägergas H_2 (0.6 bar).

b) Koinjektion mit meso-Lanthionin.

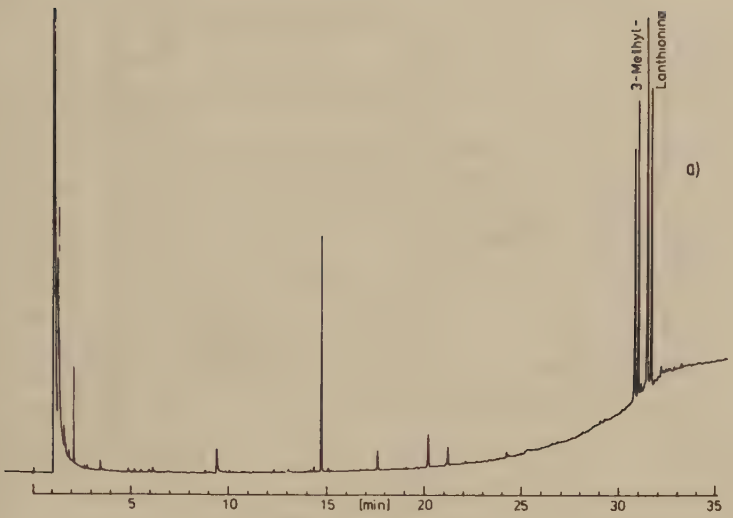


Abb. 11: a) Gaschromatographische Trennung der diastereomeren 3-Methyllanthioninderivate an Chirasil-Val (Pfp/ Methylester). T = 80/3/4/200, Trägergas H_2 (0.6 bar).

Die Aminosäurenanalyse eines Totalhydrolysats von Epidermin mit einer Testmischung aus meso-Lanthionin ergab einen Gehalt von 2 Mol meso-Diastereomeren pro Mol Antibiotikum. Der Gehalt an 3-Methyllanthionin konnte durch Aminosäurenanalyse nicht ermittelt werden, da der synthetisierte Standard der vier Diastereomeren in nur drei Fraktionen vom Harz eluiert wird. Aminosäurenanalysen, FAB- und FD-Spektren der durch tryptische Spaltung erhaltenen Fragmente P1 und P2 belegen die Anwesenheit von einem Mol 2S,3S,6R-3-Methyllanthionin in Epidermin (vgl. Abschnitt 4.).

Abb. 11: b) Koinjektion der stereoisomeren 3-Methyllanthioninderivate mit einem Totalhydrolysat aus Epidermin (Bed. vgl. 11a).

c) Koinjektion der stereoisomeren 3-Methyllanthioninderivate mit einem Totalhydrolysat aus Nisin (Bed. vgl. 11a).

3.1.4. Dehydroaminobuttersäure

Viele α,β-ungesättigte Aminosäuren werden in relativ kleinen Peptiden mikrobiellen Ursprungs gefunden, von denen die meisten eine cyclische Struktur besitzen und eine große Zahl biologischer Aktivitäten aufweisen (62,63). Die Detektion solcher Dehydroaminosäuren in Peptiden wird dadurch erschwert, daß bei saurer Hydrolyse Wasser an die Doppelbindung angelagert wird, und in einem zweiten Schritt die Peptidbindung unter Bildung eines Säureamids und einer α-Ketosäure zerfällt (Abb. 12). Durch das Fehlen einer Aminofunktion entzieht sich die Ketosäure dem Nachweis mit Ninhydrin.

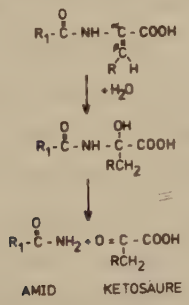


Abb. 12: Umwandlung einer α,β-ungesättigten Aminosäure in ein Säureamid und eine α-Ketosäure bei saurer Hydrolyse.

Analytisch lassen sich Dehydroaminosäuren durch katalytische Hydrierung und Nachweis der entstehenden α-Aminosäuren (64), durch Addition von Nukleophilen (z.B. Benzylmercaptan) und Detektion der entstehenden Derivate der α-Aminosäuren (51) oder durch die ^{1}H- und ^{13}C-Kernresonanzspektren der nativen Strukturen nachweisen.

Das Vorkommen von Dehydroalanin und Dehydrobutyrin in Nisin bzw. Subtilin (38,51) veranlaßte eine Suche nach Dehydroaminosäuren in Epidermin.

Ein erster, wenngleich trivialer Hinweis auf Dehydroaminobuttersäure wurde durch den Geruch des Totalhydrolysats nach Suppenwürze gefunden. Dieser Geruch stammte von der 2-Ketobuttersäure, dem Hydrolyseprodukt von Dehydrobutyrin. Eine analoge Beobachtung wurde auch bei der Strukturaufklärung des Glykolipononapeptid-Antibiotikums Herbicolin A (65) gemacht, das ebenfalls Dehydroaminobuttersäure (Dhb) enthält.
Im ^{1}H-Kernresonanzspektrum des Antibiotikums (Abb. 20, Abschnitt 5.) konnte das signifikante Quartett von CH_{β} bei 6.45 ppm und das Dublett der terminalen Methylgruppe bei 1.7 ppm detektiert werden. In Korrelation zum ^{1}H-Kernresonanzspektrum wurden im ^{13}C-Spektrum ein olefinisches Signal bei 130.6 ppm und eine hochfeld verschobene Carbonylgruppe bei 165.6 ppm gefunden (Abb. 16, Abschnitt 5.).

Da die Hydrierung von Epidermin zunächst Schwierigkeiten bereitete und die Addition von Benzylmercaptan (51) an die Doppelbindung nicht zum gewünschten Produkt führte, wurde das Abbauprodukt von Dehydrobutyrin, 2-Ketobuttersäure, klassisch nachgewiesen. Durch Fällung der Ketosäure aus dem Totalhydrolysat mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin (66) und dünnschichtchromatographischem Vergleich mit synthetisch hergestelltem Hydrazon konnte die Anwesenheit von 2-Ketobuttersäure im Totalhydrolysat eindeutig nachgewiesen werden. Auch die Massenspektren der beiden Hydrazone waren identisch.

3.1.5. Weitere Bausteine von Epidermin

Neben Dehydrobutyrin enthält das Antibiotikum noch eine weitere, unter den Bedingungen der sauren Totalhydrolyse ebenfalls instabile Komponente. Ihre chemische Natur konnte erst im Zuge der Sequenzierung der C-terminalen Hälfte von Epidermin geklärt werden. Da diese Dissertation dem Leser auch einen Eindruck vom chronologischen Verlauf der Strukturaufklärung geben soll, wird dieser Baustein im Abschnitt 7. abgehandelt.

4. SEQUENZIERUNG VON EPIDERMIN

4.1. Strategie

Bei der Strukturaufklärung ribosomal synthetisierter Proteine hat die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zum entscheidenden Durchbruch verholfen. Die Proteine, meist mit Hilfe der HPLC gereinigt, werden durch enzymatische Spaltungen in kleinere Oligopeptide zerlegt (67,68). Beim sich anschließenden Peptid-Mapping mittels HPLC an Umkehrphasen werden die Fragmente isoliert und dem klassischen EDMAN-Abbau zugeführt (69). Die Verwendung von Gasphasensequenatoren (70) verbunden mit der Detektion der abgebauten PTH-Aminosäuren mittels HPLC erlaubt es heute, Strukturaufklärungen im Picomolbereich durchzuführen. In günstigen Fällen können Oligopeptide oder enzymatische Fragmente mit bis zu 50 Aminosäuren in einem Schritt abgebaut werden.

Bei der Strukturaufklärung von Peptidantibiotika muß dieses Verfahren in wesentlichen Punkten modifiziert werden. Die nukleinsäureunabhängige Synthese dieser Wirkstoffe führt dazu, daß ihre Sequenz nicht nur aus den 20 Proteinaminosäuren aufgebaut wird. Neben vielen ungewöhnlichen sowie D-konfigurierten Aminosäuren besitzen Peptidantibiotika oft nichtpeptidische Komponenten wie Fett- oder Hydroxysäuren, Zucker oder Chromophore (15). Die Modifizierung ihrer Termini sowie das Auftreten cyclischer Strukturen verhindern einen Abbau nach EDMAN.

Die Methode der Wahl zur Sequenzanalyse dieser Wirkstoffe ist die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie, bei

der das Oligopeptid durch Partialhydrolyse und Derivatisierung flüchtiger gemacht und mittels GC/MS analysiert wird. Diese von WEYGAND und PROX (71) entwickelte Methode wurde erstmals 1967 durch BAYER, KÖNIG und JUNG auf Cysteinpeptide angewandt (72,73). Mehrere Peptidantibiotika aus unserer Arbeitsgruppe konnten in den letzten Jahren damit sequenziert werden: Trichotoxin A-40 (74,75), Alamethicin F-50 (76), Suzukacillin A (77), Iturin A_L (78) und Amiclenomycin-Peptide (79).

4.2. Vorversuche zur selektiven Fragmentierung

Die Sequenzierung von Epidermin wurde zu einem Zeitpunkt begonnen, bei dem nur die Proteinaminosäuren des Antibiotikums identifiziert waren. In Pilotversuchen wurde der Wirkstoff acidolytischen sowie enzymatischen Fragmentierungen ausgesetzt.
Partialhydrolysen mittels konzentrierter HCl bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (6 N HCl, 80 °C, 1.5 h; 6 N HCl, 80 °C, 3 h; 0.1 N HCl, 80 °C, 3 h; 10 N HCl, 37 °C, 48 h) ergaben Spaltungsmuster, welche auf bevorzugte, jedoch nicht selektive Fragmentierungsstellen hinwiesen. Die Verwendung wasserfreier Trifluoressigsäure, eine Methode, welche bei den in unserem Arbeitskreis aufgeklärten Peptidantibiotika Suzukacillin (77) und Trichotoxin (74) zu einer selektiven Fragmentierung führte, war auch bei Epidermin den Acidolysen mittels HCl überlegen. Zeitabhängige Trifluoracetolysen ergaben eine spezifische Spaltung nach 24 h bei 37 °C. Als allen Partialhydrolysen überlegen erwies sich die

Anwendung enzymatischer Methoden, so daß auf die präparative Aufarbeitung der chemisch durchgeführten Acidolysen verzichtet wurde.

Um einen Überblick über die enzymatische Fragmentierung von Epidermin zu erhalten wurden sowohl spezifische (Trypsin, α-Chymotrypsin, Thermolysin, Collagenase, Pepsin) wie unspezifische Proteasen (Pronase) verwandt, deren Spaltungsverhalten dem Substrat angepaßt war (69). Mit Pepsin (spaltet bevorzugt an der Carboxygruppe hydrophober Aminosäuren), Thermolysin (hydrolysiert N-terminal Peptidbindungen von Aminosäureresten, die eine hydrophobe Seitenkette tragen) und Collagenase (spaltet N-terminal von Prolin) wurde trotz verlängerter Inkubation (7 d) keine Hydrolyse peptidischer Bindungen erhalten. Erfolgreicher waren die im nächsten Abschnitt behandelten Umsetzungen mit Trypsin, α-Chymotrypsin und Pronase.

4.3. Enzymatische Spaltungen

Die Umsetzung von Epidermin mit Trypsin (spaltet am Carboxylende basischer Aminosäuren) führte in kurzer Zeit zum völligen Verlust der antibiotischen Aktivität. Dünnschichtchromatographisch konnten in den alkalischen Systemen I und II zwei im folgenden als P1 und P2 (bzw. P2')[+] bezeichnete Spaltprodukte nachgewiesen werden (Abb. 13). Die Anfärbung von P1 gelang mit Wasser, Ninhydrin und Chlor/TDM, während P2 unter UV-Licht (λ = 254 nm), mit Wasser, Chlor/TDM, Orcin/Schwefelsäure und Anisaldehyd/Schwefelsäure

---

[+] vgl. Abschnitt 4.4.

detektiert werden konnte. Die Ninhydrinreaktion an P2 (P2') verlief negativ. Bei der tryptischen Spaltung beobachtete man das Auftreten eines gallertartigen Niederschlags, der nach Abzentrifugieren und Dünnschichtchromatographie mit P2 (P2') korreliert werden konnte.

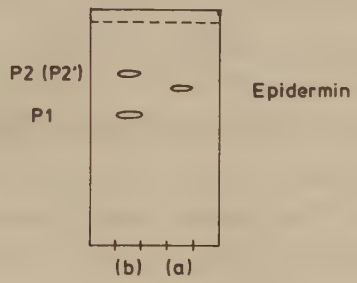


Abb. 13: Dünnschichtchromatogramm von Epidermin (a) vor tryptischer Spaltung (b) nach tryptischer Spaltung. System I, Detektion durch Sprühen mit Wasser.

Die Inkubation von Epidermin mit α-Chymotrypsin (hydrolysiert an der Carboxy-Gruppe aromatischer oder hydrophober Aminosäuren) führte nach sieben Tagen zu einer 50 proz. Umsetzung. Neben dem nativen Antibiotikum konnten mit Ninhydrin zwei weitere Spaltprodukte detektiert werden, wobei ein Fragment durch Dünnschichtchromatographie und HPLC als identisch mit P1 identifiziert werden konnte. P1 entstand durch tryptische Spaltung, offensichtlich war das verwendete α-Chymotrypsin mit Trypsin kontaminiert. Das Problem der Verunreinigung von Enzymen mit Fremdproteasen wird im Verlauf der vorliegenden Arbeit noch öfters auftreten. Das durch α-Chymo-

tryptische Spaltung erhaltene zweite Spaltprodukt wurde wegen der ungünstig verlaufenden enzymatischen Spaltung nicht weiter charakterisiert.

Die geringste Spezifität zeigte erwartungsgemäß Pronase aus Streptomyces griseus. Pronase ist kein einheitliches Enzym, sondern setzt sich aus verschiedenen Endo- und Exopeptidasen zusammen (80). Durch Anfärbung mit Ninhydrin konnten vier Hauptprodukte detektiert werden.

Die ersten präparativen tryptischen Spaltungen von Epidermin wurden in N-Ethylmorpholiniumacetat-Puffer durchgeführt. N-Ethylmorpholiniumacetat konnte später bei sonst gleicher Methodik durch den flüchtigen Ammoniumacetat-Puffer substituiert werden. Nach 24 h erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von Eisessig bis pH 4. Zur vollständigen Fällung wurde auf 0 °C abgekühlt, der gallertartige Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand lyophilisiert.

Aus dem gefriergetrockneten Überstand konnte P1 durch Säulenchromatographie an Sephadex G-25 in reiner Form isoliert werden.

Das extrem hydrophobe Zentrifugat konnte durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 mit Dimethylformamid als Elutionsmittel in zwei Fraktionen zerlegt werden. Das HPLC-Chromatogramm der zuerst eluierten Fraktion zeigte, daß es sich um ein Gemisch vieler Peptide handelte ($P2^{I}$), während die retardierte Fraktion aus einer einzigen Komponente (P2) bestand (Abb. 14).

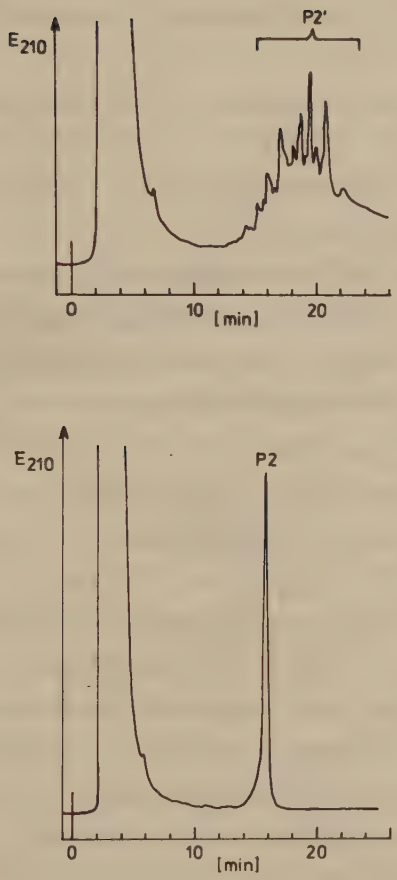


Abb. 14: HPLC-Chromatogramme der durch tryptische Spaltung erhaltenen Fragmente a) P2', b) P2. µ Bondapak C_{18} (300 x 3.9 mm). System A = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (10:90), B = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (70:30); linearer Gradient von 10 % B auf 70 % B in 30 min, 1.5 ml/min.

4.4. Charakterisierung der tryptischen Fragmente P1 und P2 bzw. P2'

Die Aminosäurenanalyse von Fragment P1 lieferte folgende Zusammensetzung:

Pro (1), Lan (1), 3-Me-Lan (1), Gly (1), Ala (2), Ile (2), Phe (1), Lys (2).

Da durch Dansylierung (81) des Gesamtmoleküls Isoleucin als N-terminale Aminosäure bestimmt wurde und das Fragment P2 kein Isoleucin enthielt, mußte P1 das N-terminale Spaltprodukt des Gesamtmoleküls sein. Die C-terminale Aminosäure von P1 war Lysin, da P1 durch tryptische Spaltung entstand.

Die durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 erhaltenen Fraktionen P2 und P2' waren in ihrer α-Aminosäurenzusammensetzung identisch:

Asx (1), Lan (1), Gly (1), Phe (1), Tyr (1).

Aus den ^{1}H- und ^{13}C-Kernresonanzspektren der an Sephadex LH-20 gereinigten Fraktion P2 (Abb. 21 und Abb. 18, Abschnitt 5) ließen sich durch Vergleich mit den Spektren des Gesamtmoleküls (Abb. 16 und 20, Abschnitt 5) eine Reihe wichtiger Informationen entnehmen:

a) Das ^{13}C-NMR-Signal der Carbonylgruppe der in Epidermin vorhandenen Dehydroaminobuttersäure (δ = 165.6) erfuhr beim Übergang zum Fragment P2 eine Hochfeldverschiebung um 3.5 ppm. Zusätzlich fand man im Spektrum von P2 ein stark tieffeldverschobenes Carbonylsignal bei 199.5 ppm.

b) Im ^{1}H-Spektrum von P2 war das Quartett des β-ständigen Protons sowie das Dublett der Methylgruppe von Dehydrobutyrin verschwunden.

c) Obwohl die α-Aminosäuren von P2 keine Methylgruppe besaßen, tauchten in den Kernresonanzspektren typische Signale einer Methylgruppe auf.

Die Nichtanfärbbarkeit von P2 mit Ninhydrin deutete auf eine N-terminale Blockierung des tryptischen Fragments hin. Verursacht wurde dies durch einen α-Ketobutyrylrest, welcher sich bei der enzymatischen Umsetzung aus Dehydrobutyrin bildet (62). Die tryptische Spaltung setzt die Aminofunktion der auf Lysin C-terminal folgenden Dehydroaminobuttersäure frei. Dehydroaminosäuren mit freier Aminogruppe sind instabil und wandeln sich in die entsprechenden α-Ketosäuren um (63,82) (Abb. 15).

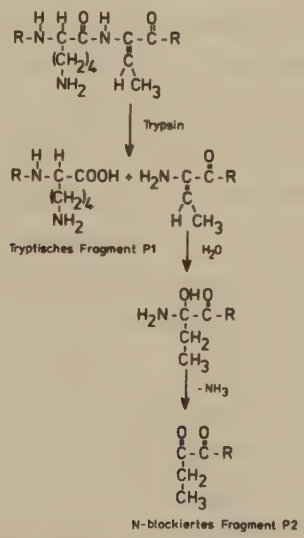


Abb. 15: Bildung des N-terminal blockierten Fragments P2 bei der tryptischen Spaltung von Epidermin.

Offensichtlich war diese Reaktion mit der Bildung einer erheblichen Anzahl von Nebenprodukten verbunden (vgl. HPLC-Chromatogramm Abb. 14). Die negativ verlaufende Ninhydrinreaktion an diesen Fragmenten deutete ebenfalls auf eine Blockierung ihrer N-Termini hin. Wegen der starken Heterogenität von P2' wurde auf eine weitergehende Charakterisierung des Gemisches verzichtet.

Die Peptidbindung zwischen Lysin und Dehydrobutyrin ist die bevorzugte Spaltstelle bei enzymatischen und acidolytischen Fragmentierungen von Epidermin. Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich wies das Bruchstück P1 sowohl bei den durch Trifluoracetolysen als auch durch Spaltung mit Salzsäure entstandenen Peptiden nach.

5. SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN EPIDERMIN SOWIE SEINEN TRYPTISCHEN FRAGMENTEN P1 UND P2

Die vorgenommenen spektroskopischen Untersuchungen zielten auf weitergehende Informationen über die Natur des säurelabilen Bausteins in Epidermin ab (vgl. Abschnitt 3.1.5.).

5.1. ^{13}C-Kernresonanzspektroskopie

Wegen der geringen natürlichen Häufigkeit von ^{13}C sind Kopplungen zwischen zwei ^{13}C-Kernen selten im Spektrum sichtbar. Starke Aufspaltungen der ^{13}C-Resonanzen entstehen hingegen durch Kopplung mit benachbarten Protonen, da die ^{13}C-^{1}H-Kopplungskonstanten sehr groß sind. Dies wird bei der "Off-Resonance"-Methode ausgenützt. Die zusätzlichen Informationen über die Zahl der an die Kohlenstoffatome gebundenen Protonen wird bei größeren Peptiden rasch durch die wachsende Unübersichtlichkeit der Spektren kompensiert. Oligopeptide werden deßhalb routinemäßig mit dem empfindlichen Verfahren der Protonen-Breitbandentkopplung vermessen, wobei alle ^{13}C-Signale als Singuletts auftreten. J-modulierte Spin-Echo-Aufnahmen ermöglichen auch bei entkoppelten Spektren die Unterscheidung zwischen primären, tertiären und sekundären bzw. quartären Kohlenstoffatomen.
Die Qualität eines Spektrums wird durch die Wahl der zur Aufnahme verwendeten Lösungsmittel erheblich beeinflußt. Neben einer guten Löslichkeit sollte auf eine niedrige Viskosität der resultierenden Lösung geachtet werden, da sonst starke Signalverbreiterungen

auftreten. Wässrige bzw. methanolische Lösungen schieden deshalb trotz hoher Löslichkeit des hier untersuchten Polypeptidantibiotikums aus. Dimethylformamid erwies sich hinsichtlich der Löslichkeit und Viskosität als geeignetes Lösungsmittel zur Aufnahme des ^{13}C-NMR-Spektrums von Epidermin (Abb. 16).

Im Carbonylbereich konnte die relativ breite Absorption bei 175.3 ppm den Acetatresten zugeordnet werden, da das basische Peptid bei der Isolierung als Tris-Acetat anfiel. Die durch Konjugationseffekte verschobene Carbonylgruppe von Dehydrobutyrin befand sich bei 165.6 ppm.

Im Aromatenbereich verblieben nach Zuordnung der Absorptionen von Phenylalanin und Tyrosin zunächst drei Kohlenstoffe bei 131.8, 130.6 und 102.6 ppm. Das Signal bei 130.6 ppm verschwand im Spektrum von P2, folgerichtig mußte es dem C_α der Dehydrobuttersäure zugeordnet werden. Das β-Kohlenstoffatom von Dehydrobutyrin ist im Spektrum verdeckt. Die Signale bei 131.8 und 102.6 ppm gehörten zu der unbekannten Komponente, da sie ebenfalls im Spektrum von P2 enthalten waren.

Im Aliphatenbereich fiel das intensive Signal bei 23.0 ppm auf, das durch die Methylgruppen der Acetatreste verursacht wurde. Die sieben Methylgruppen von Alanin, Isoleucin und 3-Methyllanthionin erschienen im Bereich von 11-18 ppm.

Das ^{13}C-Kernresonanzspektrum des durch tryptische Spaltung erhaltenen Peptids P1 wurde in $^{12}C,^{2}H$-Dimethylsulfoxid vermessen (Abb. 17). Beim Vergleich der Spektren muß deshalb eine Lösungsmittelverschiebung im Vergleich zu den in Dimethylformamid ver-

messenen Spektren berücksichtigt werden. Diese Verschiebung kann insbesondere im Carbonylbereich erheblich sein.

Aus dem Spektrum des C-terminalen Teils P2 (Abb. 18) konnte eine Reihe wichtiger Informationen entnommen werden:

a) Im Carbonylbereich waren 9 Absorptionen vorhanden, wobei die stark verschobenen Signale bei 199.5 und 162.2 ppm den beiden Oxogruppen des Pyruvylrestes zuzuordnen waren.

b) Neben den Absorptionen von Phenylalanin und Tyrosin traten auch die beiden der unbekannten Komponente zugeordneten Signale bei 131.7 und 102.3 ppm im aromatischen Bereich des Spektrums wieder auf.

c) Im aliphatischen Teil des Spektrums von P2 waren zwei zusätzliche Absorptionen zu erkennen.

d) Die Methylgruppe der α-Ketobuttersäure erschien bei 7.15 ppm.

Legenden zu den Abbildungen 16-19:

Abb. 16: ^{13}C-Kernresonanzspektrum (100.6 MHz) von Epidermin; [^{12}C,^{2}H]-Dimethylformamid, c = 40 mg/0.5 ml, 45360 Interferogramme.

Abb. 17: ^{13}C-Kernresonanzspektrum (100.6 MHz) des tryptischen Fragments P1; [^{12}C,^{2}H]-Dimethylsulfoxid, c = 20 mg/0.5 ml, 34208 Interferogramme.

Abb. 18: ^{13}C-Kernresonanzspektrum (100.6 MHz) von P2; [^{12}C,^{2}H]-Dimethylformamid, c = 12 mg/0.5 ml, 38300 Interferogramme.

Abb. 19: J-moduliertes Spin-Echo-Spektrum von P2 (100.6 MHz); [^{12}C,^{2}H]-Dimethylformamid, c = 25 mg/0.5 ml, 27146 Interferogramme.

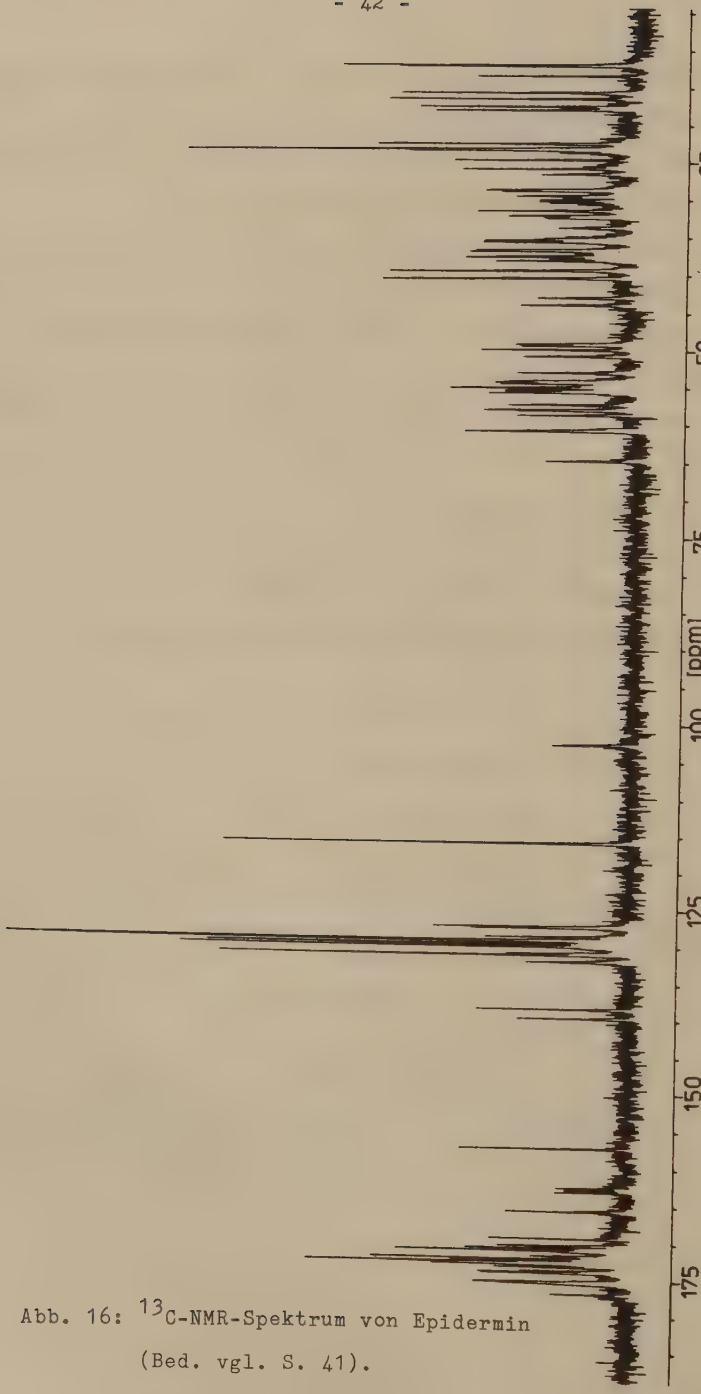


Abb. 16: ^{13}C-NMR-Spektrum von Epidermin
(Bed. vgl. S. 41).

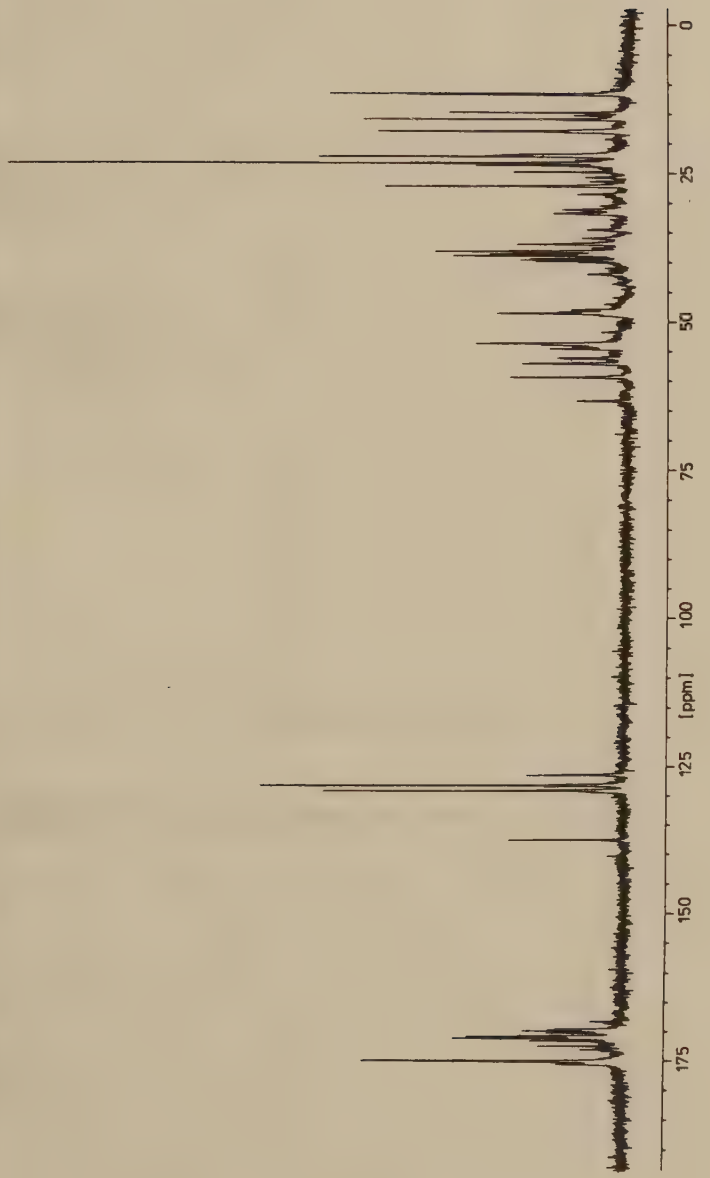


Abb. 17: ^{13}C-Kernresonanzspektrum von P1 (Bed. vgl. S. 41).

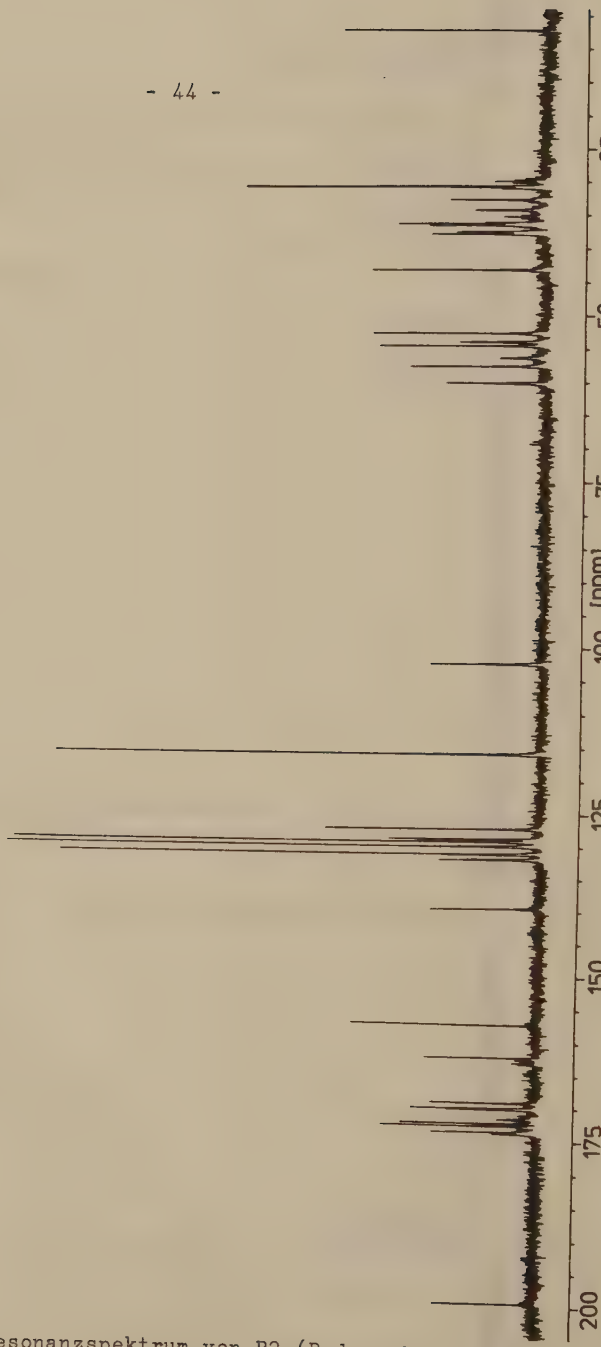


Abb. 18: ^{13}C-Kernresonanzspektrum von P2 (Bed. vgl. S. 41).

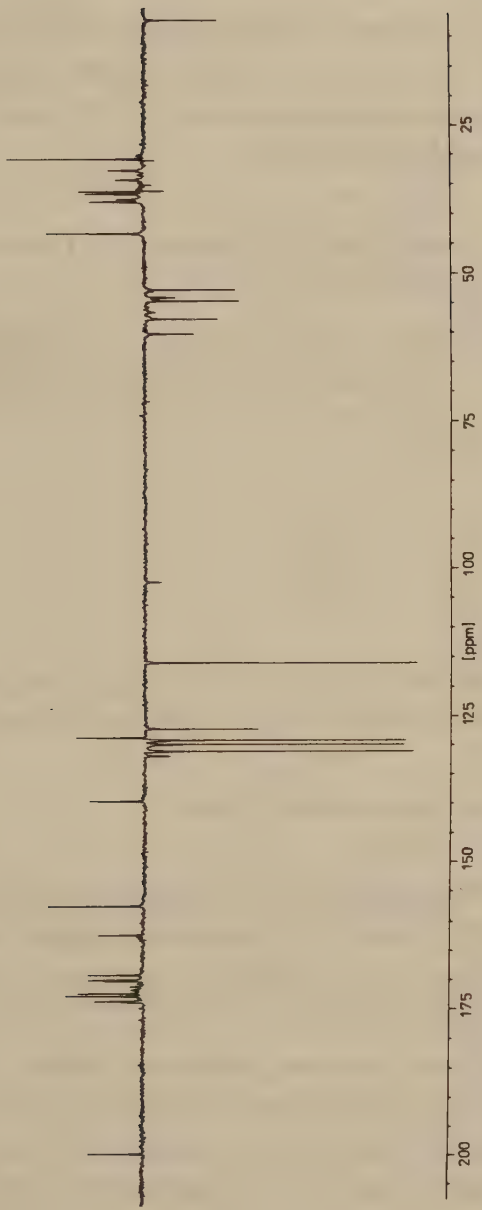


Abb. 19: J-moduliertes Spin-Echo-Spektrum von P2 (Bed. vgl. S. 41).

Die fünf dem unbekannten Baustein zugeordneten Kohlenstoffsignale konnten auf Grund ihrer chemischen Verschiebung und ihrem Erscheinen im J-modulierten Spin-Echo-Spektrum von P2 (Abb. 19) noch näher charakterisiert werden (Tab. 1).

Tab. 1: ^{13}C-NMR-Signale der säurelabilen Komponente von Epidermin.

Lage des Signals (ppm)	Zuordnung
169-174	C=O
131.7	CH
102.3	CH
52-60	CH
30-38	CH_2

Eine vollständige Zuordnung und Diskussion der gesamten ^{13}C-NMR-Spektren von Epidermin, P1 und P2 erfolgt in Abschnitt 8.1.

5.2. ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie

Die ^{1}H-Kernresonanzspektren von Epidermin und seinem tryptischen Spaltprodukt P2 waren im aliphatischen Bereich sehr komplex, in den aromatischen Teilen konnten jedoch wichtige Zuordnungen getroffen werden.
Das im nativen Antibiotikum vorhandene Quartett von CH_β der Dehydroaminobuttersäure (Abb. 20) war im Spektrum von P2 nicht mehr enthalten (Abb. 21). Das sowohl im nativen Antibiotikum als auch in P2 auftretende Dublett bei 5.6 ppm korrelierte mit dem ^{13}C-Signal

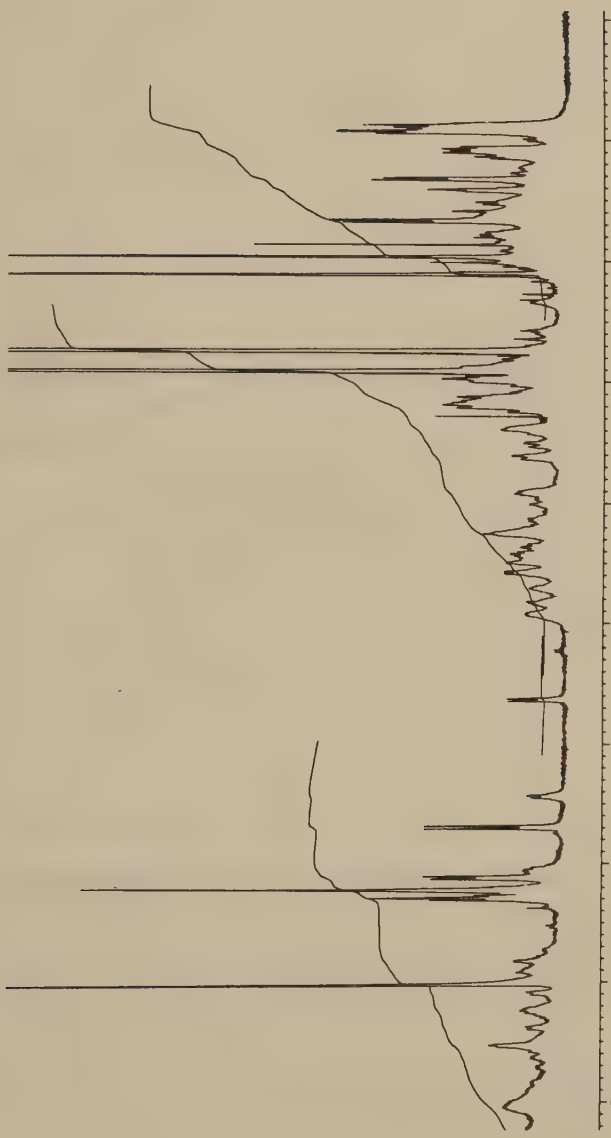


Abb. 20: ^{1}H-Kernresonanzspektrum (400 MHz) von Epidermin in D_7-DMF (c = 15 mg/0.5 ml).

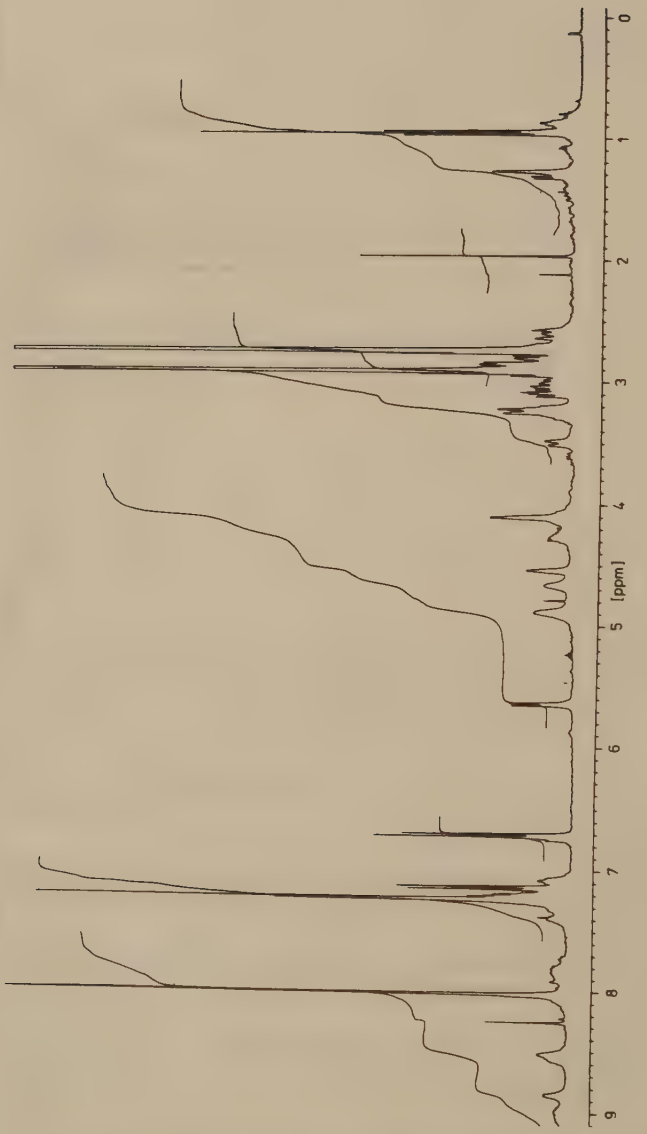


Abb. 21: ^{1}H-Kernresonanzspektrum des tryptischen Fragments P2 in D_7-DMF (c = 10 mg/0.5 ml).

bei 102.3 ppm. Neben der Absorption von Phenylalanin bei 7.22 ppm traten weitere Signale bei 7.29 (Epidermin) bzw. 7.24 ppm (P2) auf.

Im Spektrum von P2 erkannte man sehr schön das Triplett der Methylgruppe des α-Ketobutyrylrestes.

5.3. UV-Spektroskopie

Das UV-Spektrum von Epidermin in wässriger Lösung besaß ein langwelliges Absorptionsmaximum bei 267 nm (Abb. 22). Die Lage dieser Bande sowie der hohe Extinktionskoeffizient (ε = 11000) konnte mit dem Absorptionsverhalten von Tyrosin in neutralen Lösungen (λ = 267 nm, ε = 1400) (83-85) nicht in Einklang gebracht werden, spielte aber bei der weiteren Strukturaufklärung von P2 eine wichtige Rolle (vgl. Abschnitt 7.).
Im UV-Spektrum von P2 trat neben λ = 267 nm ein zweites Maximum bei 226 nm auf, verursacht durch die in P2 vorhandene 2-Ketobuttersäure (86)(Abb. 23).

5.4. IR-Spektroskopie

Die im Infrarotspektrum einer Substanz auftretenden Banden lassen auf die Anwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen schließen (87,88). Peptidlactone z.B. können durch die Lage ihrer Carbonylbande, die als Schulter der Amid I C=O-Valenzschwingung auftritt, ohne Schwierigkeiten detektiert werden.
Die Infrarotspektren des nativen Antibiotikums Epidermin sowie seiner tryptischen Fragmente P1 und P2 sind in den Abbildungen 24-26 enthalten, die Zuordnung charakteristischer Frequenzen zeigt Tab. 2.

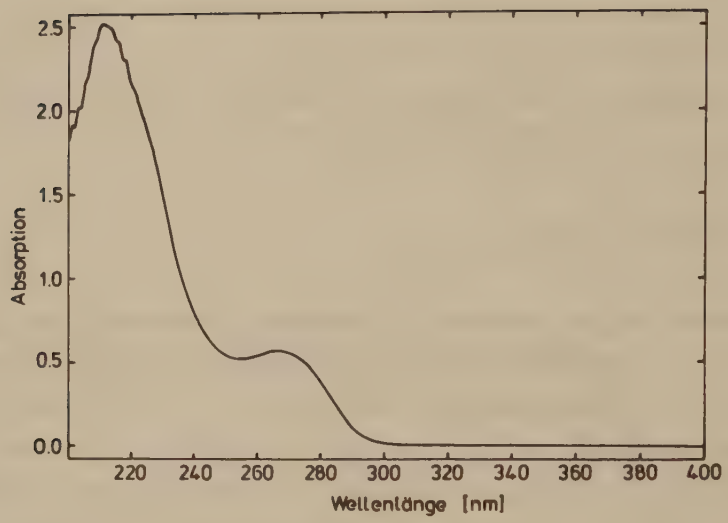


Abb. 22: UV-Spektrum von Epidermin in H_2O (c = 0.15 mg/ml).

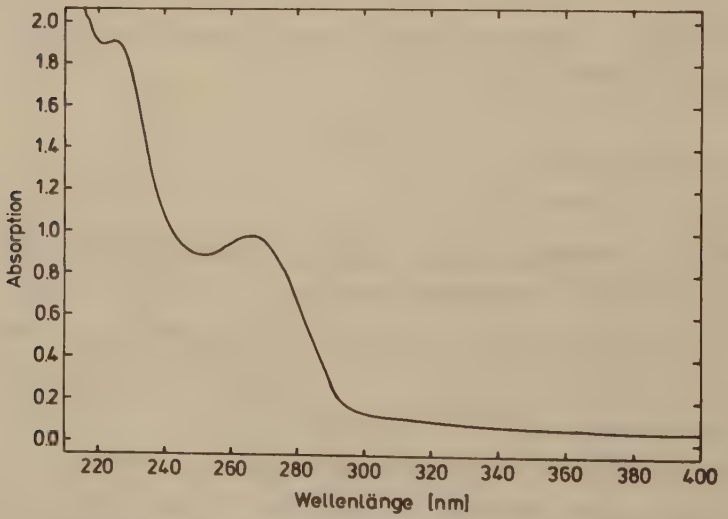


Abb. 23: UV-Spektrum von P2 in Methanol (c = 0.1 mg/ml).

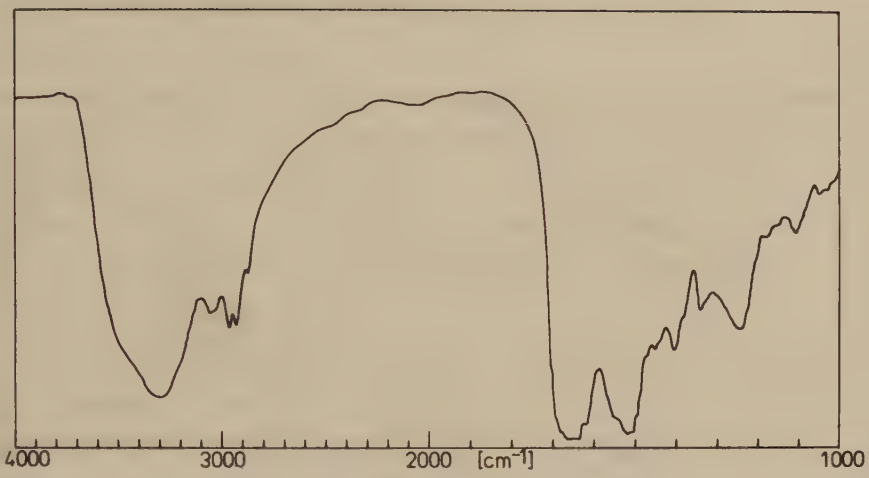


Abb. 24: IR-Spektrum von Epidermin in KBr.

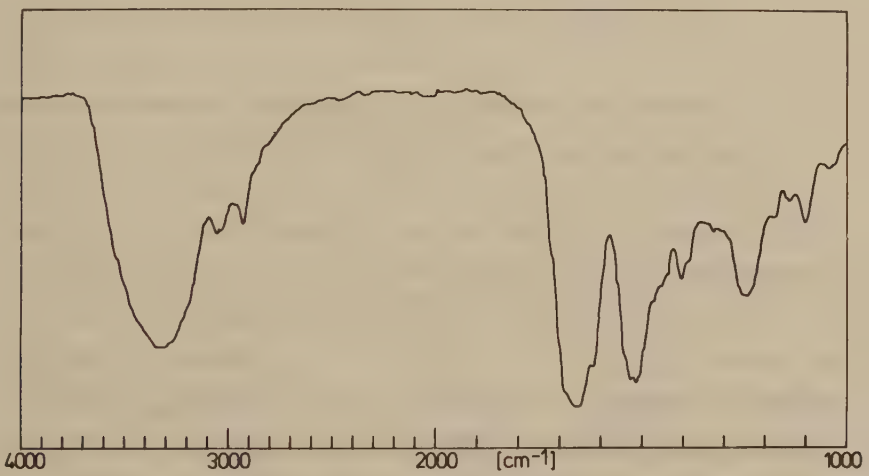


Abb. 25: IR-Spektrum von P2 in KBr.

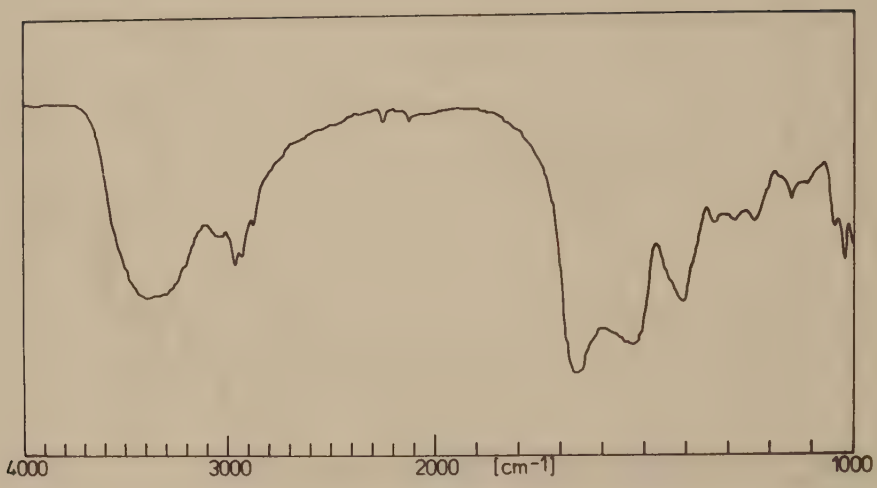


Abb. 26: IR-Spektrum von P1 in KBr.

Tab. 2: Zuordnung charakteristischer Frequenzen in den IR-Spektren von Epidermin, P1 und P2.

Schwingungsart	Epidermin	P1	P2
N-H Valenz	3340	3380	3340
Aryl-H, C-H Valenz	3060	3060	3060
$-CH_2$, $-CH_3$, C-H Valenz	2960	2960	2930
Amid I	1660	1660	1660
Amid II	1520	1525	1520
Tyrosin (Phenol-OH)	1240		1250

5.5. FD- und FAB-Massenspektrometrie

Die Entwicklung der FD- und FAB-Massenspektrometrie (89-92) erlaubt dem Analytiker, die Molmassen polarer, schwerflüchtiger oder nicht-flüchtiger Verbindungen wie Oligosaccharide, Oligopeptide und Oligonucleotide mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Mit der FAB-Methode können auch Sequenzanalysen durchgeführt werden (vgl. Abschnitt 6.5.).

Sowohl das FD- (Abb. 27) als auch das FAB-Massenspektrum (Abb. 28) des tryptischen Fragments P1 zeigten eine Molmasse von $[M+2H]^+$ = 1303. Diese Molmasse war im Einklang mit den durch Aminosäurenanalyse und Gaschromatographie an Chirasil-Val ermittelten Bausteinen von P1.

Ein ⊕-FAB-Massenspektrum des tryptischen Fragments P2 war nicht zu erhalten, im FD-Spektrum konnte m/e = 906 als $[M+Na]^+$-Signal detektiert werden. Dies entspricht einer realen Molmasse von 881 für das Spaltstück P2 (vgl. Abschnitt 7.4.).

Addiert man die Molmassen der Fragmente P1 und P2 unter Berücksichtigung der Wasser-Addition bei der tryptischen Spaltung und der Massendifferenz zwischen Dehydroaminobuttersäure und 2-Ketobuttersäure, so erhält man eine Molmasse von 2163 für das native Antibiotikum.

In zwei von TAYLOR bzw. EADY et al. 1983 veröffentlichten Arbeiten (93,94) wird über ein Polypeptidantibiotikum aus Staphylococcus epidermidis berichtet, welches ebenfalls eine Molmasse von 2163 besitzt. Die Proteinaminosäurenzusammensetzung beider Antibiotika differiert jedoch erheblich, Angaben über Nichtproteinaminosäuren waren in diesen Arbeiten nicht enthalten.

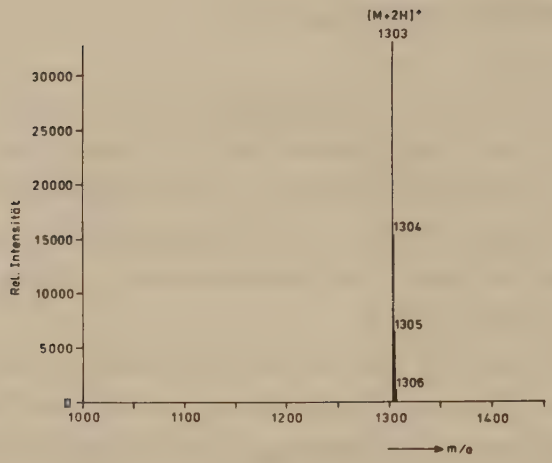


Abb. 27: FD-Massenspektrum des tryptischen Fragments P1.

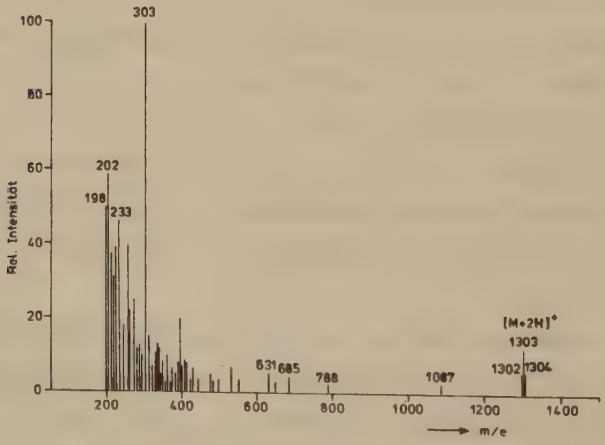


Abb. 28: FAB-Massenspektrum des tryptischen Fragments P1.

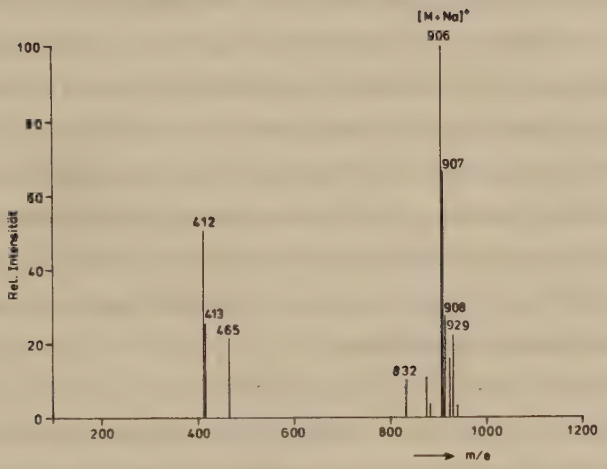


Abb. 29: FD-Massenspektrum des tryptischen Fragments P2.

6. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON P1

6.1. Strategie

Die Entwicklung einer Strategie zur weiteren Sequenzierung von P1 mußte folgenden experimentellen Ergebnissen Rechnung tragen:

a) Isoleucin ist N-terminaler Bestandteil von P1 (Dansylierung).

b) Die Alaninreste von Lanthionin bzw. Alanin- und Aminobuttersäurereste von 3-Methyllanthionin sind Bestandteil der Peptidkette, da die Dansylierung des Gesamtmoleküls den Gehalt an Thioetheraminosäuren unverändert läßt. Epidermin weist einen analogen heterodet cyclischen Bau auf wie Nisin und Subtilin.

c) Aufgrund des FAB-Massenspektrums von P1 müssen Alanin bzw. Lysin die Positionen 12 und 13 der Sequenz besetzen.

Die nochmalige Spaltung von P1 mittels enzymatischer bzw. acidolytischer Methoden war nicht empfehlenswert, da die Hydrolyse peptidischer Bindungen innerhalb der Cyclen zu Abbauprodukten führte, welche ebensowenig wie das Ausgangsmolekül für einen vollständigen EDMAN-Abbau geeignet waren. Die dünnschichtchromatographische Unterscheidung zwischen für den EDMAN-Abbau brauchbaren und unbrauchbaren Peptiden war nicht möglich.

Eine Überführung Sulfidbrücken enthaltender Oligopeptide in nach EDMAN sequenzierbare Strukturen gelingt auf zwei voneinander unabhängigen Wegen. Bei der oxidativen Spaltung der Thioether wird zunächst die Schwefelbrücke mit Peroxyameisensäure zum Sulfon oxidiert. Die Einwirkung von Natriumbisulfit bei erhöhter Temperatur liefert unter β-Elimination bei

anschließender Bisulfitaddition Sulfinsäuren, welche durch erneute Umsetzung mit Peroxyameisensäure zu den Sulfonsäuren oxidiert werden. Das Produkt der Oxidation von Cystein oder Cystin ist somit dasselbe wie das der Oxidation von Lanthionin gefolgt von Bisulfitaddition und erneuter Oxidation: Cysteinsäure.
Dieses Verfahren wurde von GROSS und MORELL (43) bei der Strukturaufklärung von Nisin angewandt. Nachteilig wirkt sich beim anschließenden EDMAN-Abbau der hohe Gehalt an Cysteinsäure aus, da PTH-Cysteinsäure nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar ist (69). Der hohe Gehalt an Cysteinsäureresten verbietet außerdem wegen geringer Flüchtigkeit des Peptids die Anwendung der Massenspektrometrie über die Polyaminoalkoholmethode zur Sequenzierung (95).
Die Entschwefelung der Thioetheraminosäuren durch Raney-Nickel, ein Verfahren, das bei der Strukturaufklärung von Subtilin durch GROSS (48,49) angewandt wurde, setzt aus meso-Lanthionin D- und L-Alanin frei, während 2S,3S,6R-3-Methyllanthionin in L-Alanin und D-Aminobuttersäure zerfällt. Am entschwefelten Peptid ist sowohl der EDMAN-Abbau als auch die Sequenzierung nach der Polyaminoalkoholmethode möglich.
Bei beiden Verfahren muß die genaue Lage der Sulfidbrücken durch zusätzliche Experimente bestimmt werden, da z.B. am entschwefelten Peptid keine Differenzierung zwischen nativem L-Alanin und dem aus meso-Lanthionin erhaltenen L-Enantiomeren möglich ist.

Ähnliche Probleme treten bei cystinhaltigen Strukturen wie z.B. den Bienengiftkomponenten Apamin (96,97) und MCD-Peptid (98,99)

auf, bei denen ebenfalls nach oxidativer Ringöffnung und anschließendem EDMAN-Abbau die Lage der Disulfidbrücken durch weitere Untersuchungen geklärt werden mußte (100).
Wegen der besseren Sequenzierbarkeit des entstehenden Peptids und der einfacheren Derivatisierung wurde der Entschwefelung durch Raney-Nickel der Vorzug gegeben.

6.2. Desulfurierung-Wahl des geeigneten Katalysators

Schwefelhaltige Aminosäuren weisen eine sehr unterschiedliche Reaktivität gegenüber Raney-Nickel auf (101). Bei neutralem pH in wässrigen Lösungen und Raumtemperatur können Cystin und Cystein enthaltende Peptide schonend und selektiv in alaninhaltige Sequenzen überführt werden. Thioetheraminosäuren wie Methionin oder Lanthionin werden bei erhöhten Temperaturen angegriffen. Die Reaktion kann zudem durch die Wahl des Katalysators beeinflußt werden. Raney-Nickel der höchsten Aktivitätsstufe W6 (102) weist gegenüber der Aktivitätsstufe W2 (103) erhöhte Umsetzungsraten auf, muß aber unter erheblichen Sicherheitsvorkehrungen hergestellt werden. Präparationen älter als eine Woche können bei beiden Typen nicht verwendet werden, da durch Lagerung ein starker Aktivitätsabfall eintritt.
Die Umsetzung von Lanthionin mit Raney-Nickel W2 (H_2O, pH 7, 60 °C) bewies, daß auch der Katalysator mit geringerer Aktivität zur Entschwefelung geeignet war. Nach 60 min war dünnschichtchromatographisch kein Lanthionin mehr nachweisbar.

Die Reaktion des nativen Antibiotikums mit Raney-Nickel W2 (H_2O, pH 7, 60 °C, 4 h) wurde durch folgende experimentelle Ergebnisse beurteilt:

a) In der Aminosäurenanalyse des entschwefelten Peptids waren Lanthionin und 3-Methyllanthionin fast völlig verschwunden, der Alaninwert des Hydrolysats war drastisch erhöht. Die an der Stelle von Cystein auftretende Absorption wurde durch α-Aminobuttersäure aus 3-Methyllanthionin verursacht (Abb. 30).

b) Die gaschromatographische Trennung des derivatisierten Totalhydrolysats an Chirasil-Val wies D-Alanin und D-α-Aminobuttersäure nach.

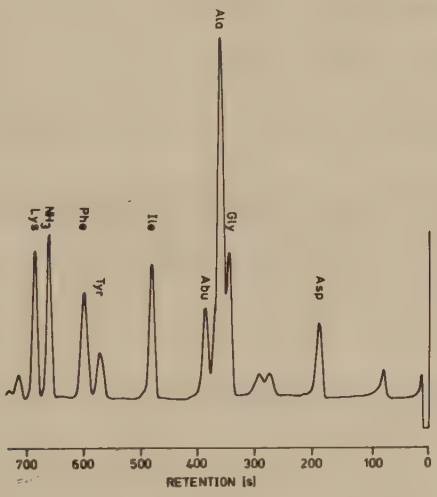


Abb. 30: Elutionschromatogramm eines sauren Totalhydrolysats des entschwefelten Antibiotikums (Ninhydrin-Detektion, λ = 570 nm).

Der Reaktionsverlauf konnte dünnschichtchromatographisch nicht verfolgt werden, da das Antibiotikum vollständig an den Katalysator adsorbierte. Das gleiche Problem trat bei den ebenfalls zu diesem Zeitpunkt begonnenen Hydrierungen der in Epidermin enthaltenen Doppelbindungen mit Palladium/Aktivkohle auf (vgl. Abschnitt 7). Ein Teil der Reaktionsprodukte konnte durch mehrmalige Suspension des Katalysators in Eisessig abgelöst werden.

Ähnliche Chemisorptionseffekte waren bei der Entschwefelung des durch tryptische Spaltung erhaltenen N-terminalen Fragments zu erwarten, da in P1 alle für die Chemisorption verantwortlichen basischen Funktionen enthalten waren. Das Ablösen des C-terminalen Lysinrestes vor Entschwefelung konnte diese Adsorptionseffekte mindern. Das Restpeptid enthielt nach Entschwefelung eine weitere potentielle Spaltstelle durch Trypsin (vor Desulfurierung erfolgte an Lys^4 in Epidermin sowie in P1 aus sterischen Gründen kein enzymatischer Angriff). Durch die stark unterschiedliche Polarität der beiden dann zugänglichen Spaltprodukte sollte eine einfache Aufarbeitung des Hydrolysegemisches möglich sein, ein weiterer Vorteil dieser modifizierten Strategie.

6.3. Umsetzung von P1 mit Carboxypeptidase B

Carboxypeptidase B ist eine wichtige Exopeptidase für die Endgruppenbestimmung von Proteinen und Peptiden. Sie weist eine größere Spezifität als Carboxypeptidase A und Y auf, da sie nur die C-terminale Spaltung von Proteinen und Peptiden mit den Aminosäuren L-Lysin, L-Arginin und L-Ornithin katalysiert (69). Diese

igenschaften können zur Detektion tryptischer Fragmente herange-
ogen werden, da gerade sie basische Funktionen in C-terminalen
ositionen enthalten.
ie zunächst im Mikromaßstab durchgeführte enzymatische Spaltung
on P1 mit Carboxypeptidase B (0.05 N Ammoniumacetat pH 8.0,
.01 M $CaCl_2$, 30 °C) zeigte im Dünnschichtchromatogramm nach 3 h
ollständige Umsetzung (Abb. 31).

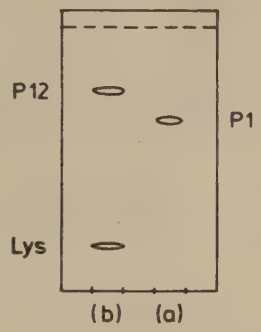


Abb. 31: Dünnschichtchromatogramm (System I) von P1 (a) vor Umsetzung (b) nach Umsetzung mit Carboxypeptidase B. Detektion: Ninhydrin.

Präparative Ansätze wurden nach Ansäuern lyophilisiert und der
verbleibende Rückstand an Sephadex G-25 in 1 % Essigsäure gel-
chromatographiert. Die so erhaltene N-terminale Sequenz 1-12 (P12)
fiel dünnschicht- und HPLC-rein an. Die Aminosäurenanalyse des
Restpeptids bewies die selektive Abspaltung von Lysin:

Pro (1), Lan (1), 3-Me-Lan (1), Gly (1), Ala (2),
Ile (2), Phe (1), Lys (1).

Der im FAB-Massenspektrum von P12 auftretende $[M+H]^+$-Peak bei
1174 (Abb. 32) zeigte die einheitliche Bindungsspaltung an. C-ter-
minale Aminosäure von P12 war Alanin, entsprechend m/e = 1103 aus
der N-terminalen Fragmentierung (C-Serie) des Peptids.

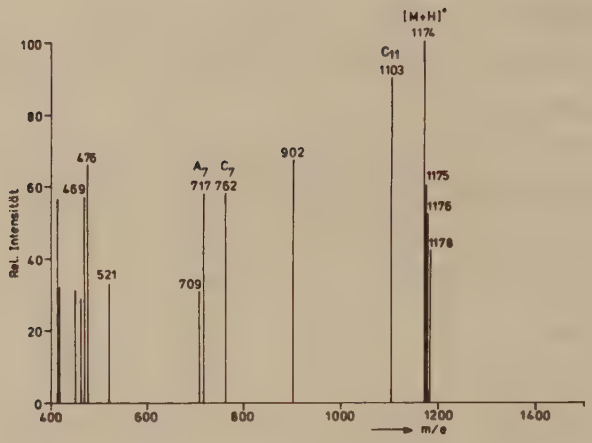


Abb. 32: ⊕-FAB-Massenspektrum von P12 (Molmasse berechnet 1173).

6.4. Entschwefelung von P12

Die Desulfurierung des durch enzymatische Spaltung erhaltenen Peptids P12 wurde mit Raney-Nickel W2 (103) (H_2O, pH 7, 60 °C, 4 h) durchgeführt. Bei allen Ansätzen wurden z.T. erhebliche Nebenreaktionen beobachtet. Eine Unterdosierung des schlecht abzumessenden Katalysators führte zu einer partiellen Desulfurierung, so daß das Reaktionsgemisch aus fünf Hauptprodukten bestand. Bei einer Überdosierung wurde zwar eine vollständige Entschwefelung erreicht, diese mußte aber durch einen großen Substanzverlust wegen Chemisorptionseffekten erkauft werden. Dünnschichtchromatographisch konnte der Reaktionsverlauf nicht verfolgt werden, da das Fragment P12 aus wässrigen Lösungen vollständig an den Katalysator adsorbierte. Ein Teil der Reaktionsprodukte konnte durch Suspension

des Katalysators in Eisessig abgelöst werden, dabei gingen aber erhebliche Mengen an Nickel in Lösung. Der Peptidgehalt des nach Eindampfen der vereinigten Fraktionen erhaltenen Gemisches lag in ungünstigen Fällen bei 2 %. Eine weitere Aufarbeitung der Reaktionsprodukte war erst nach Entsalzen an Sephadex G-25 möglich. Mehrmalige Gelchromatographie an Sephadex G-25 entfernte die unvollständig entschwefelten Sequenzen, so daß die verschiedenen Ansätze auf das in Abb. 33 gezeigte Gemisch standardisiert werden konnten.

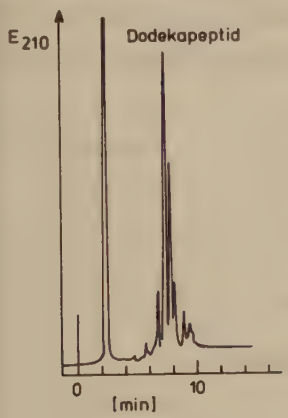


Abb. 33: HPLC-Chromatogramm der Entschwefelung von P12 mit Raney-Nickel. Nucleosil 7 C_{18} (300 x 3.9 mm); mobile Phase: A = Acetonitril/0.1 % H_3PO_4 (10:90), B = Acetonitril/0.1 % H_3PO_4 (70:30), 10 % B → 70 % B in 30 min (linear), 1.5 ml/min.

Eine weitergehende Aufreinigung durch CRAIG-Verteilung mit unterschiedlichen Systemen schlug fehl. Durch den basischen Charakter der Komponenten konnten auch keine Trennungen an Kieselgel durchgeführt werden. Erst der Einsatz der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gestattete die präparative Isolierung der entschwefelten Sequenz 1-12, deren Aminosäurenanalyse die durch-

geführte Umsetzung bestätigte:
Pro (1), Gly (1), Ala (5), Abu (1), Ile (2), Phe (1), Lys (1).
Die gaschromatographische Trennung des derivatisierten Totalhydrolysats des Dodekapeptids an chiraler stationärer Phase (Chirasil-Val) zeigte die Anwesenheit von D-konfiguriertem Alanin aus meso-Lanthionin und D-Aminobuttersäure aus 3-Methyllanthionin.

Eine weitergehende Fragmentierung des Dodekapeptids wurde durch enzymatische Spaltung mit Trypsin erreicht. Das in der Sequenz enthaltene Lysin reagierte aus sterischen Gründen (Schwefelbrücken) vor Entschwefelung nicht mit dem Enzym, nach Entschwefelung zeigte der dünnschichtchromatographische Vergleich (Abb. 34) nach 3 h vollständige tryptische Umsetzung an.

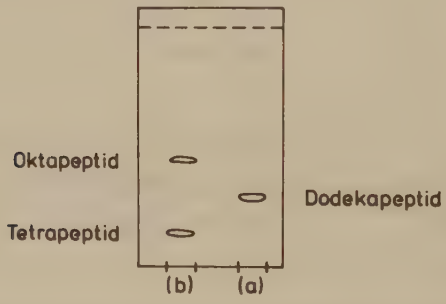


Abb. 34: Dünnschichtchromatogramm (System II) des Dodekapeptids (a) vor, (b) nach tryptischer Spaltung. Detektion: Ninhydrin.

Beide Spaltprodukte konnten durch präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen voneinander getrennt werden.

Die Aminosäurenanalyse des kleineren Bruchstückes lieferte ein Tetrapeptid folgender Zusammensetzung:

Ile (1), Ala (2), Lys (1).

Das Tetrapeptid, N-terminaler Bestandteil des Dodekapeptids, besaß folgende Sequenz:

Ile-Ala-Ala-Lys.

Die Exo-Stellung von Ile und Lys ergab sich aus der Dansylierung des Gesamtmoleküls und aus der tryptischen Natur des Spaltprodukts. Einer der beiden Alaninreste mußte aus meso-Lanthionin bei der Entschwefelung entstanden sein, da die gaschromatographische Enantiomerentrennung (Chirasil-Val) D- und L-Alanin nachwies.

Das lipophilere Oktapeptid setzte sich aus folgenden Aminosäuren zusammen:

Pro (1), Gly (1), Ala (3), Abu (1), Ile (1), Phe (1).

Die gaschromatographische Enantiomerentrennung wies D-konfigurierte α-Aminobuttersäure nach. Das FAB-Massenspektrum des Peptids P12 belegte die C-terminale Position von Alanin im Oktapeptid (Abb. 32).

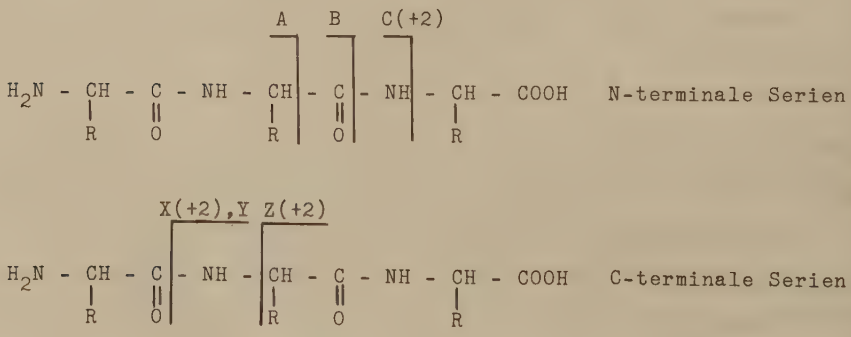
6.5. FAB-Massenspektren der entschwefelten Fragmente-Ableitung der Sequenz

Bei der Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie (FAB-MS) wird die Probe in einer schwerflüchtigen Flüssigkeit (z.B. Glycerin) gelöst und mit energiereichen Edelgasatomen ionisiert. Gute Massenspektren erhält man nur bei einer ausreichenden Löslichkeit der Probe in der Matrix. Peptide, wegen ihres zwitter-

ionischen Charakters meist gut löslich, lassen sich sowohl mit positiver als auch mit negativer Polung des Geräts untersuchen (89-92). Die für eine Aminosäure-Sequenzanalyse notwendigen Fragmentionen sind bei einer positiven Polung des Geräts intensiver, so daß die ⊕ -FAB-Spektroskopie neben der Molmasse eine Reihe von Sequenz-Informationen ohne Derivatisierung der Probe liefert.

Schema 2 illustriert die Fragmentierung von Peptiden bei der ⊕ -FAB-Spektroskopie. Durch N-terminale Fragmentierung entstehen Ionen der A, B und C-Serie, durch C-terminale Fragmentierung Ionen der X, Y und Z-Serie. Die Serien C, X und Z erscheinen im Spektrum um zwei Masseneinheiten höher als erwartet. Sie entstehen durch Fragmentierung des $(M+H)^+$-Ions bei gleichzeitiger zusätzlicher Wasserstoffübertragung.

Schema 2: Fragmentierung von Peptiden bei der ⊕ -FAB-Massenspektrometrie.



Aus dem FAB-Spektrum des durch präparative HPLC isolierten Dodekapeptids 1-12 konnte seine Sequenz entnommen werden. Da flüchtige Trifluoressigsäure als Puffer verwendet wurde, fiel die Probe salzfrei an, eine wesentliche Vorraussetzung für die Auswertbarkeit der Aufnahme.

Der niedrigste im Spektrum erscheinende m/e-Wert von 401 konnte der N-terminalen C-Serie von Ile-Ala-Ala-Lys zugeordnet werden (Abb. 35). Die neben dem Molekularpeak höchste interpretierbare Massenzahl war m/e = 971 (C_{10}).

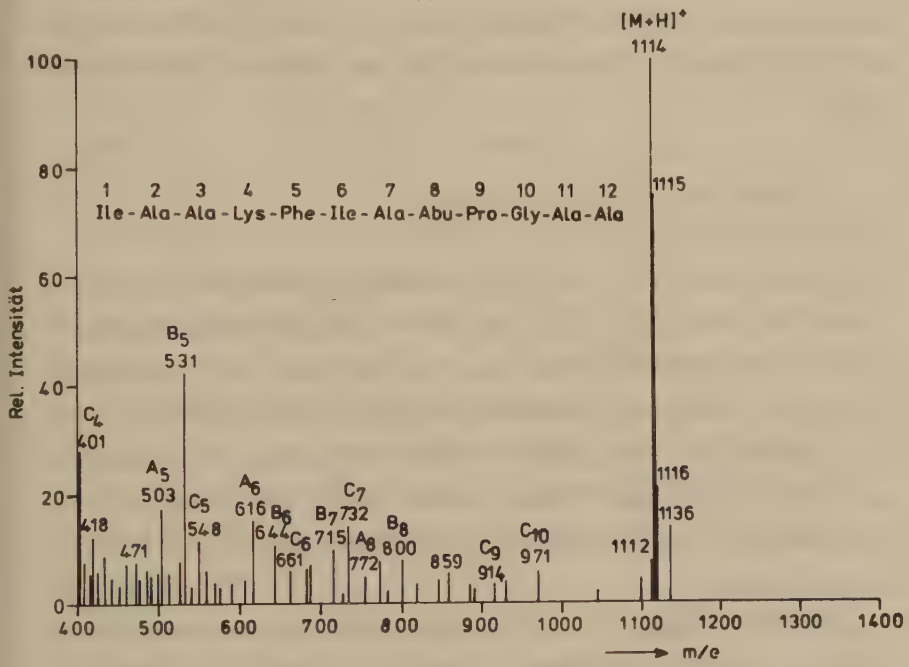


Abb. 35: FAB-Massenspektrum des Dodekapeptids 1-12 mit der daraus abgeleiteten Sequenz.

Für die Besetzung der Positionen 11 und 12 der Sequenz verblieben damit nur noch zwei Alaninreste. Die Reihenfolge innerhalb des N-terminalen Tetrapeptids konnte dem FAB-Spektrum nicht entnommen werden (Fragmentionen der X, Y und Z-Serie fehlten fast völlig), diese war aber durch die in Abschnitt 6.4. durchgeführten Überlegungen bereits festgelegt.
Die ⊕ -FAB-Spektren des durch enzymatische Spaltung erhaltenen Tetra- und Oktapeptids waren nicht auswertbar, da der bei ihrer Isolierung verwendete Phosphatpuffer vor Einengen der Lösung mit Natronlauge neutralisiert werden mußte und so zur Bildung metallhaltiger Cluster und Fragmentionen bei der Aufnahme der Spektren führte.

6.6. EDMAN-Abbau des Dodekapeptids

Beim EDMAN-Abbau (69) wird die N-terminale Aminosäure eines Peptids mittels Phenylisothiocyanat in das entsprechende Phenylthiocarbamoylpeptid überführt und dieses acidolytisch zum Thiazolinon cyclisiert, wobei die N-terminale Aminosäure unter Freisetzung eines neuen, um eine Aminosäure verkürzten Restpeptids abgespalten wird. Die entstehenden PTH-Aminosäuren können durch Dünnschicht-, Gas- oder Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (69,104) identifiziert werden.
Schwierigkeiten ergeben sich beim manuellen bzw. automatisierten Abbau bei der Extraktion der PTH-Aminosäuren durch organische Lösungsmittel. Bei kleinen oder auch sehr hydrophoben Sequenzen ist mit einem erheblichen "wash-out" beim Extraktionsvorgang zu

rechnen. In solchen Fällen scheint der Solid-Phase-EDMAN-Abbau (105,106) erfolgsversprechender. Das Peptid wird hierbei im allgemeinen C-terminal kovalent an einen unlöslichen festen Träger gebunden (aminoalkylsilylierte, poröse Glasträger) und schrittweise abgebaut.

Beim automatisierten Gasphasen-EDMAN-Abbau (107,108), der zur Zeit empfindlichsten und modernsten Technik, wird die Probe auf eine mit "Polybrene" getränkte Filterrondelle aufgetragen und in einer Glaskartusche sequenziert. "Polybrene", ein Polymer mit quartären Ammoniumgruppen, wechselwirkt mit polaren Gruppen der Peptidkette und setzt so den Extraktionsverlust an Restpeptid bei der Abtrennung der PTH-Aminosäuren herab.

Die früher zur Identifikation der PTH-Aminosäuren verwendete Dünnschicht- und Gaschromatographie wurde fast vollständig durch die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie an modifizierten Kieselgelen verdrängt. Das von LOTTSPEICH 1980 publizierte isokratische ternäre System erlaubt eine Trennung der PTH-Derivate der Proteinaminosäuren innerhalb von 19 min (109). In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. VAN DER BROEK von der Fa. Applied Biosystems wurde das durch Desulfurierung erhaltene Dodekapeptid mit dem Gasphasensequenator 470 A abgebaut, wobei die Leistungsfähigkeit dieser Methode durch die sehr kurze und hydrophobe Sequenz überprüft werden sollte.

Zum Abbau wurden 4.5 nMol Dodekapeptid in wässriger Lösung auf die Rondelle aufgetragen, in der Glaskartusche abgebaut und durch isokratische HPLC nach LOTTSPEICH die entstandenen PTH-Derivate identifiziert (Chromatogramme siehe Exp. Teil). Der durchschnitt-

liche Verlust an Restpeptid durch Extraktionsprozesse betrug pro Abbaustufe 50 %. Der durchgeführte EDMAN-Abbau bestätigte die durch FAB-Spektroskopie ermittelte Sequenz:
Ile^{1}-Ala^{2}-Ala^{3}-Lys^{4}-Phe^{5}- Ile^{6}-Ala^{7}-Abu^{8}-Pro^{9}-Gly^{10}-Ala^{11}-Ala^{12}.

6.7. Zuordnung der Schwefelbrücken-Struktur von P1

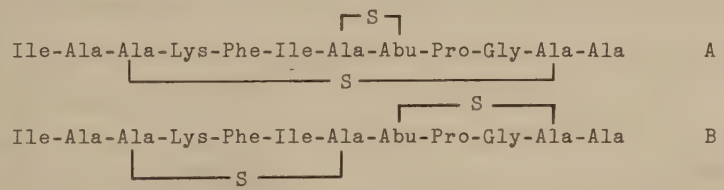
Nachdem die Sequenz 1-12 des Dodekapeptids durch FAB-MS und EDMAN-Abbau eindeutig festgelegt war, mußten im letzten Schritt die Sulfidbrücken in P1 bzw. P12 zugeordnet werden.
Eine erfolgversprechende Strategie mußte folgende experimentelle Ergebnisse berücksichtigen:

a) Der D-Alaninrest aus meso-Lanthionin war im Tetrapeptid Ile-Ala-Ala-Lys enthalten (Abschnitt 6.4.).
Leucin-Aminopeptidase setzte aus dem nativen Antibiotikum sowie aus P1 kein Isoleucin frei. Offensichtlich war die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure sterisch gehindert.

b) Der C-terminale L-Alaninrest des Dodekapeptids entstand nicht durch Desulfurierung von Lanthionin oder 3-Methyllanthionin, da er im Peptid P12 mit intakten Schwefelbrücken durch Carboxypeptidase A abgespalten werden konnte. Diese C-terminale Abspaltung von L-Alanin aus P12 war ebenfalls sterisch gehindert, ein Hinweis, daß dem benachbarten L-Alanin in der Position 11 eine Schwefelbrücke zuzuordnen war.

c) α-Aminobuttersäure, an der Position 8 der Sequenz des Dodekapeptids, war Bestandteil von 3-Methyllanthionin in P1 und P12.

Zur Festlegung der Position des D-Alaninrestes wurde ein EDMAN-Abbau am Peptid P12 mit intakten Schwefelbrücken durchgeführt. Der gesamte Abbau wurde in wässrigem N-Ethylmorpholiniumacetat bei pH 9 durchgeführt, da beim Abbau in Pyridin eine starke Oxidation der Thioetheraminosäuren zu beobachten war. Nach Totalhydrolyse und Aminosäurenanalyse der jeweils verbleibenden Restpeptide wurde nach der ersten und zweiten Stufe das Verschwinden von Isoleucin und Alanin festgestellt. Bei der zur Kontrolle durchgeführten dritten Abbaustufe ließ sich im Totalhydrolysat der Restsequenz meso-Lanthionin nicht mehr nachweisen, während 3-Methyllanthionin immer noch vorhanden war.
Durch die Plazierung des D-Alaninrestes aus meso-Lanthionin an die Position 3 der Sequenz gab es für die Zuordnung der Thioetherbrücken in P12 nur noch zwei mögliche Alternativen:

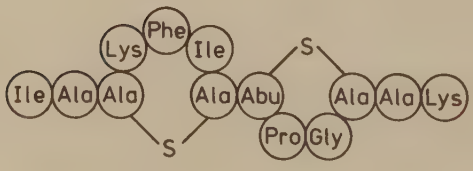


Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Ringstrukturen A und B wäre durch folgende Reaktionen möglich gewesen:
Abspaltung des C-terminalen Alanins mit Carboxypeptidase A, Methylierung des isolierten Restpeptids und anschließende Reduktion des Methylesters mit Natriumborhydrid (48). Bei der Verknüpfung nach A würde nach Totalhydrolyse in der Aminosäurenanalyse meso-Lanthionin verschwinden, da dieses in meso-Lanthioninol übergeht.

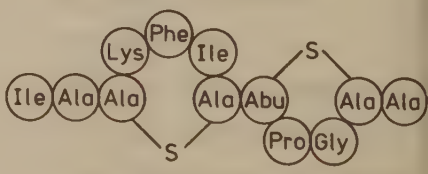
Bei der Ringstruktur B zeichnet sich das Hydrolysat durch das Fehlen von 3-Methyllanthionin aus, welches 3-Methyllanthioninol ergibt.

Bei der Umsetzung des Fragments P12 mit Carboxypeptidase A konnte Ala^{12} aus der Sequenz abgespalten werden, leider konnten aber wegen der maximal 50 proz. Umsetzungsrate und Fremdproteaseaktivitäten die entstandenen vier Reaktionsprodukte trotz zahlreicher Trennversuche mittels HPLC nicht weiter aufgereinigt werden.

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Strukturen A und B war durch FAB-Massenspektrometrie möglich. Im ⊕ -FAB-Massenspektrum des Fragments P12 (Abb. 32) waren die aus der N-terminalen Fragmentierung stammenden Sequenzionen A_7 (717) u. C_7 (762) eindeutig und reproduzierbar nachzuweisen. Diese spezifische Fragmentierung der Bindungen zwischen den schwefelhaltigen Ringen entschied eindeutig zugunsten der oben angeführten Ringstruktur B (Abb. 36).



Fragment P1

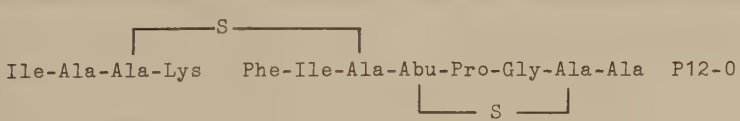


Fragment P12

Abb. 36: Struktur der N-terminalen, aus Epidermin durch enzymatische Umsetzungen erhaltenen Peptide P1 und P12.

6.8. Enzymatische Spaltung von P12 mit Endoproteinase Lys-C

Die tryptische Spaltung von Epidermin führte zur Fragmentierung des nativen Antibiotikums an der Position Lys^{13} (vgl. Abschnitt 4). Die weitere potentielle Spaltstelle Lys^{4} reagierte auch bei längerer Inkubation aus sterischen Gründen nicht mit dem Enzym. Erst nach Entfernung der Schwefelbrücken war eine Spaltung des entstandenen Dodekapeptids mit Trypsin möglich (Abschnitt 6.4.).
Die Öffnung des schwefelhaltigen Ringes 3-7 in P12 gelang mit Endoproteinase Lys-C (110,111), einem Enzym, welches spezifisch die Peptidbindungen C-terminal von Lysinresten spaltet. Nach 28 h und 50 proz. Umsetzung wurde wegen beginnender Nebenreaktionen abgebrochen. Das durch semipräparative HPLC isolierte, offenkettige Fragment P12-O besaß naturgemäß die gleiche Aminosäurenanalyse wie das heterodet cyclische Fragment P12.
Leucin-Aminopeptidase setzte aus dem Fragment P12-O dünnschichtchromatographisch nachweisbares Phenylalanin frei, ein weiterer Beweis für die selektive Bindungsspaltung zwischen Lys^{4} und Phe^{5}.



Im FAB-Spektrum von P12-O (Abb. 37) war der $[M+H]^+$-Peak bei m/e = 1192 um 18 Masseneinheiten gegenüber $[M+H]^+$ von P12 verschoben. Die gleiche Verschiebung beobachtete man bei dem für die Zuordnung der Schwefelbrücken wichtigen Sequenzion C_7 (m/e =780).

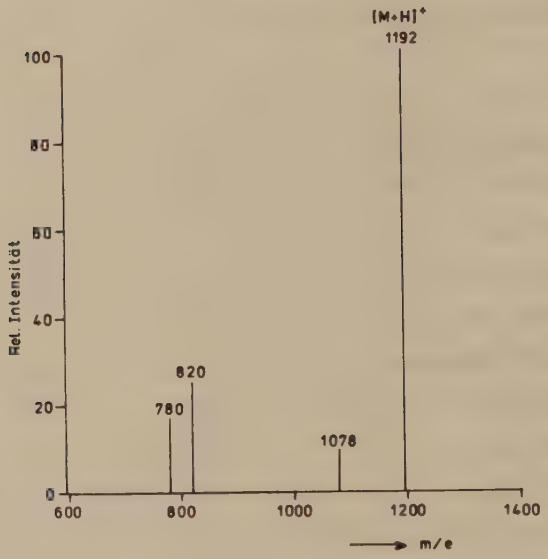


Abb. 37: ⊕ -FAB-Massenspektrum des offenkettigen Fragments P12-O.

6.9. Schematische Zusammenfassung der Strukturaufklärung von P1

Abb. 38 zeigt eine kurze, abschließende Zusammenfassung über die Strukturaufklärung der durch enzymatische Umsetzung gewonnenen Peptide P1 und P12.

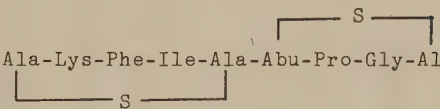
Methode	Resultat der Untersuchungen
Tryptische Spaltung; Bestimmung der exo-ständigen Aminosäuren durch Dansylierung und Umsetzung mit Carboxypeptidase B.	Ile-(2 Ala,Ile,Phe,Lys,Gly,Pro,Ala-S-Ala,Abu-S-Ala)-Lys
Spaltung mit Carboxypeptidase B, Umsetzung mit Carboxypeptidase A.	Ile-(Ala,Ile,Phe,Lys,Gly,Pro,Ala-S-Ala,Abu-S-Ala)-Ala
Entschwefelung mit Raney-Nickel.	Ile-(3 L-Ala,D-Ala,Pro,Gly,Phe,Lys,Abu,Ile)-Ala
Sequenzbestimmung durch FAB-MS, EDMAN-Abbau	Ile-Ala-Ala-Lys-Phe-Ile-Ala-Abu-Pro-Gly-Ala-Ala
Schwefelbrückenzuordnung und Bestimmung der Position von D-Alanin durch tryptische Spaltung, EDMAN-Abbau und FAB-MS.	 P 12

Abb. 38: Schematische Zusammenfassung der Strukturaufklärung von P1 bzw. P12.

7. STRUKTUR DES TRYPTISCHEN FRAGMENTS P2

7.1. Strategie

Spektroskopische sowie chemische Untersuchungen ließen eine erfolgreiche Aufklärung des aus tryptischer Spaltung entstandenen C-terminalen Fragments von Epidermin als problematisch erscheinen:

a) Die aus der Dehydroaminobuttersäure (Dhb) entstandene 2-Ketobuttersäure blockierte die N-terminale Aminogruppe von P2 und verhinderte eine Sequenzierung nach EDMAN (vgl. Abschnitt 4.4.).

b) Eine Blockierung der C-terminalen Aminogruppe von P2 war ebenfalls anzunehmen, da aus dem nativen Antibiotikum mit Carboxypeptidase A und B keine Aminosäure abzuspalten war. Auch der Versuch, eventuell vorhandene freie Carboxygruppen in Epidermin mit Diazomethan oder methanolischer HCl-Lösung zu verestern, verlief negativ.

c) Selbst bei einer erfolgreichen Entfernung der N-terminalen Blockierung würde das in P2 vorhandene meso-Lanthionin einen daraufhin möglichen EDMAN-Abbau nur bis zu dem aus dieser Aminosäure gebildeten Sulfidringes zulassen.

d) Ungeklärt war ferner das langwellige Maximum von 267 nm in den UV-Spektren von Epidermin (Abb. 22) und P2 (Abb. 23). Die Lage sowie der hohe Extinktionskoeffizient konnten mit dem Absorptionsverhalten von Tyrosin nicht in Einklang gebracht werden.

e) Die Molmasse der in P2 durch Aminosäurenanalyse und spektroskopische Untersuchungen detektierten Bausteine

2-Ketobuttersäure, Asn, Tyr, Phe, Gly, meso-Lan

betrug 738 (berechnet als Aminosäurerest ohne Wasser). Die Differenz von 145 Masseneinheiten auf die durch FD-MS ermittelte Molmasse von 883 (vgl. Abschnitt 5.5.) mußte mit der noch unbekannten Komponente im C-terminalen Fragment korreliert werden.

f) Die ausgesprochen schlechte Löslichkeit von P2 in wässrigen und alkoholischen Lösungen ließ keine weiteren enzymatischen Spaltungen zu.

Da alle gängigen modernen Verfahren der Sequenzierung von Peptiden und Polypeptiden (EDMAN-Abbau (69), GC/MS-Analyse der Polyaminoalkohol-O-trimethylsilyl-Derivate von Peptiden (112), FAB-Massenspektrometrie (89-92)) lineare Strukturen erfordern, sollte zunächst der aus meso-Lanthionin gebildete Ring durch Entschwefelung entfernt werden.

7.2. Umsetzung von P2 mit Raney-Nickel

Die Entschwefelung des tryptischen Fragments P2 mit Raney-Nickel W2 (103) verlief nicht einheitlich. Sowohl die Dünnschichtchromatographie als auch die Analyse mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Abb. 39) zeigten die Bildung von drei Reaktionsprodukten an. Aus dieser Mischung wurden die beiden lipophilen Komponenten P21 und P22 durch präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie oder durch Gelchromatographie an

Sephadex LH-20 in größeren Mengen isoliert und charakterisiert.

Im sauren Totalhydrolysat des Reaktionsproduktes P21 war meso-Lanthionin vollständig verschwunden, dafür konnten jedoch drei Alaninreste in der Aminosäurenanalyse nachgewiesen werden (Tab. 3). Durch die Entschwefelung des in P2 vorhandenen meso-Lanthionins waren zwei Alaninreste (D- und L-Alanin) zu erwarten. Das Auftauchen eines weiteren Alanins konnte zunächst nicht erklärt werden, sondern mußte mit dem in P2 noch fehlenden Baustein in Korrelation gebracht werden.

Die Aminosäurenanalyse des lipophileren Reaktionsproduktes P22 zeigte neben meso-Lanthionin einen zusätzlichen Alaninrest an. Offensichtlich handelte es sich bei P22 um ein nicht völlig entschwefeltes Produkt.

Die gaschromatographische Enantiomerentrennung des derivatisierten Totalhydrolysats ergab D- und L-Alanin im Verhältnis 2:1. Im Totalhydrolysat von P22 konnten gaschromatographisch D-Alanin und meso-Lanthionin nachgewiesen werden (Abb. 40). Die D-Konfiguration des aus P2 durch Umsetzung mit Raney-Nickel erhaltenen zusätzlichen Alaninrestes war Beweis für seine Beteiligung an einer heterodet cyclischen Bauweise des C-terminalen tryptischen Fragments (vgl. Biosynthese Abschnitt 10.).

Die Molmassenbestimmung mittels FD-Massenspektrometrie zeigte für P21 eine Molmasse von 825 an, während für P22 im FAB-Spektrum M^+ = 855 detektiert werden konnte. Bezog man bei beiden Peptidstrukturen den durch Reaktion von P2 mit Raney-Nickel entstandenen D-Alaninrest in die Berechnung der Molmasse mit ein, so erhielt

Tab. 3: Charakterisierung der aus dem Epidermin-Fragment P2 durch Behandlung mit Raney-Nickel hergestellten Peptide.

Reaktionsprodukte	P21	P22
Aminosäurenanalyse und Gas-	2 D-Ala	1 D-Ala
chromatographie an Chirasil-	1 L-Ala	meso-Lan
Val	1 L-Phe	1 L-Phe
	1 L-Tyr	1 L-Tyr
	1 L-Asp	1 L-Asp
	1 Gly	1 Gly
UV-Maximum (Methanol)	λ = 277 nm	λ = 277 nm
Molmasse	825 (FD)	855 (FAB)

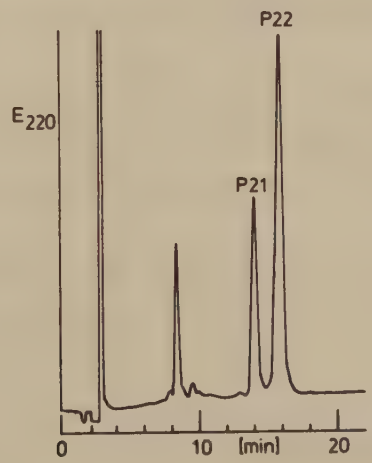


Abb. 39: HPLC-Trennung der Desulfurierungsprodukte von P2. Säule: Nucleosil 7 C_{18} (250 x 8 mm). Mobile Phase: Acetonitril (22 %), Wasser (78 %), Trifluoressigsäure (0.1 %). Fluß 4 ml/min.

man in beiden Fällen eine Differenz von 44 Masseneinheiten zwischen berechneter und gemessener Molmasse.

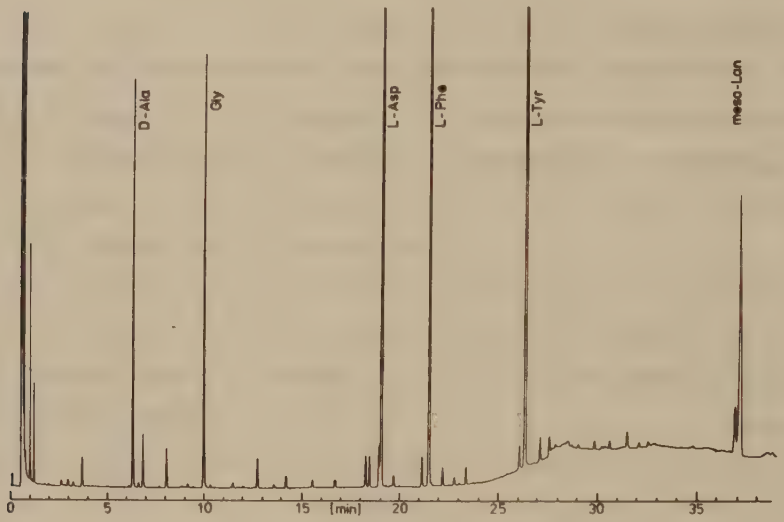


Abb. 40: Gaschromatogramm der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester eines sauren Totalhydrolysats von P22. T = 80/3/4/200, Trägergas H_2 (Chirasil-Val).

Die UV-Spektren der beiden Peptide P21 und P22 zeigten eine bathochrome Verschiebung von 267 nm (P2, Abb. 23) auf das Tyrosin-Maximum von 277 nm, die von einer starken Hypochromie begleitet war.

Im ^{1}H-Kernresonanzspektrum der Sequenz P21 (Abb. 41) konnten im aliphatischen Bereich die drei Dubletts bei 1.36, 1.24 und 1.15 ppm den Methylgruppen der Alaninreste zugeordnet werden. Neben

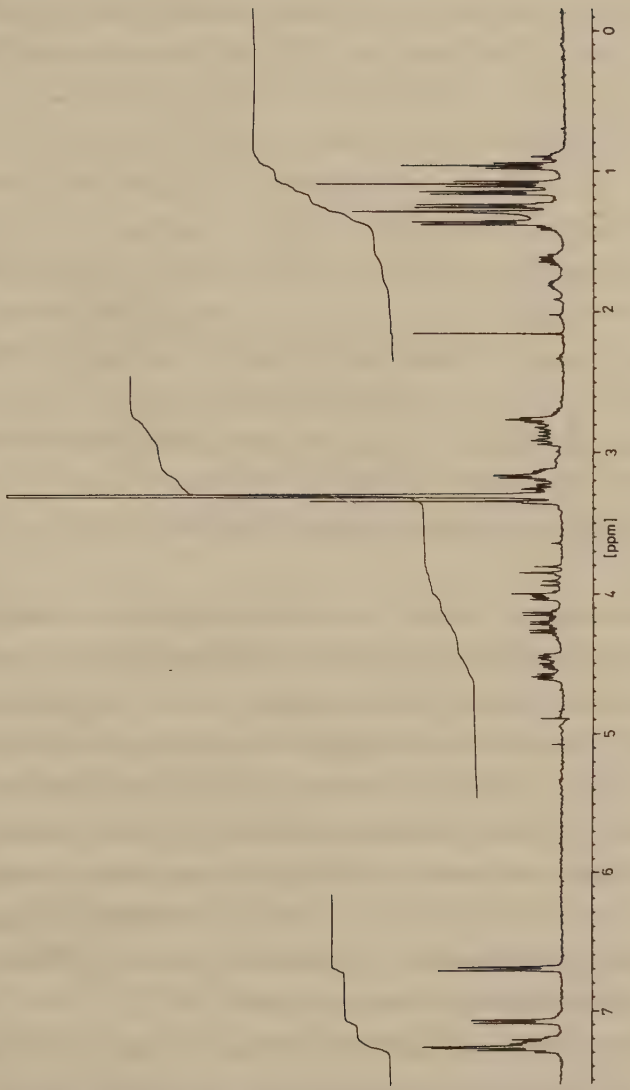


Abb. 41: ^{1}H-Kernresonanzspektrum (400 MHz) des Fragments P21;
c = 5 mg/0.5 ml CD_3OD.

dem Triplett der schon in P2 aufgefundenen N-terminalen 2-Ketobutyrylgruppe (0.97 ppm, Abb. 21) trat im Spektrum von P21 ein weiteres, zunächst nicht korrelierbares Triplett bei 1.08 ppm auf. Das im nativen Antibiotikum (Abb. 20) und noch in P2 (Abb. 21) vorhandene olefinische Signal bei 5.7 ppm war im Spektrum von P21 nicht zu detektieren. Analoge Ergebnisse waren dem ^{1}H-Kernresonanzspektrum von P22 zu entnehmen (nicht abgebildet).

Die beiden Peptide P21 und P22 waren im Gegensatz zum nicht mit Raney-Nickel behandelten Fragment P2 sehr gut in Methanol und mäßig in schwach alkalischen Medien löslich. Diese günstigen Eigenschaften legten weitere enzymatische Spaltungen nahe.

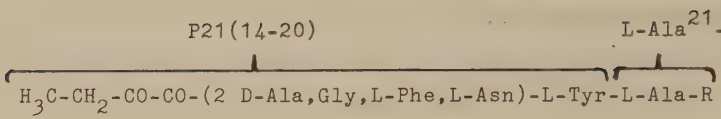
7.3. Enzymatische Spaltungen der Peptide P21 und P22

In Pilotversuchen wurde die schwefelbrückenfreie Sequenz P21 mit Carboxypeptidase A, Pepsin, Thermolysin und α-Chymotrypsin umgesetzt. Während mit Carboxypeptidase A und Pepsin keine Reaktion eintrat, konnte mit Thermolysin eine 60 proz. und mit α-Chymotrypsin eine 100 proz. Umsetzung nach 24 h erreicht werden. Das im dünnschichtchromatographischen und HPLC-analytischen Vergleich identische Fragmentierungsverhalten beider Enzyme wies auf eine α-chymotryptische Verunreinigung in Thermolysin hin, da α-Chymotrypsin C-terminal, Thermolysin jedoch N-terminal von hydrophoben Aminosäuren spaltet (69).
Im Dünnschichtchromatogramm des α-chymotryptischen Hydrolysats (Abb. 42) ließ sich das Spaltprodukt P21(14-20) nur mit Chlor/TDM detektieren, während das zweite Reaktionsprodukt Ala^{21}-R auch

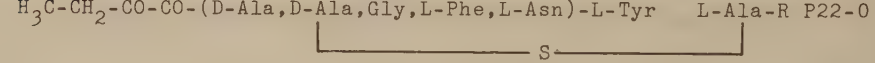
mit Ninhydrin nachzuweisen war.

Abb. 42: Dünnschichtchromatogramm (System III) von P21 (1), P22 (2), P21 + α-Chymotrypsin (3) und P22 + α-Chymotrypsin (4). Gestrichelte Flecken sind nur mit Chlor/TDM zu detektieren.

Präparative Ansätze erlaubten die Isolierung des N-blockierten, ninhydrinnegativen Fragments P21(14-20), dessen Analytik mittels Aminosäurenanalyse und Gaschromatographie an Chirasil-Val das Fehlen eines L-Alaninrestes (aus meso-Lanthionin) anzeigte. Im dünnschichtchromatographischen Vergleich waren jedoch die R_F-Werte von Alanin als Standard und dem Fragment L-Ala^{21}-R unterschiedlich, ein eindeutiger Beweis für die Abspaltung eines alaninhaltigen Bruchstückes aus P21.
Aus P21(14-20) konnte durch Umsetzung mit Carboxypeptidase A Tyrosin als C-terminale Aminosäure identifiziert werden; mit diesen Ergebnissen ergab sich folgendes Bild der Struktur von P21:



Die Sequenz P22 mit dem intakten meso-Lanthioninring ließ sich ebenfalls mit α-Chymotrypsin umsetzen (Abb. 42). Das einzige, ninhydrinpositive Reaktionsprodukt P22-0 besaß die gleiche Aminosäurenzusammensetzung wie die Ausgangssequenz P22, hatte jedoch eine um 18 Masseneinheiten höhere Molmasse. Das von L-Ala^{21} ausgehende meso-Lanthionin mußte somit die beiden Spaltprodukte noch über eine Thioetherbrücke verbinden:



7.4. Struktur des α-chymotryptischen Spaltproduktes L-Ala^{21}-R

Die durch FAB- und FD-Massenspektrometrie ermittelten Molmassen von P21 (825), P22 (855) und P22-0 (873) konnten unter Berücksichtigung der für R schon im Abschnitt 7.2. ermittelten Masse von 44 miteinander korreliert werden. Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß alle durch FD- und FAB-Massenspektrometrie ermittelten Molmassen der mit α-Ketobuttersäure N-terminal blockierten Fragmente P2, P21, P22, P21(14-20) und P22-0 um zwei Masseneinheiten höher lagen als erwartet. Eine mögliche Erklärung bestand in der intermediären Reduktion der α-Ketogruppe des Pyruvylrestes zum Alkohol in der für die Messungen ver-

wendeten Matrix. Die für alle hier durchgeführten Berechnungen verwendeten experimentellen Molmassen müssen in der Realität um zwei Einheiten erniedrigt werden.
Ein weiterer, wichtiger Hinweis auf die Natur von L-Ala^{21}-R wurde dem Protonenspektrum von P21 (Abb. 41) entnommen. Das in diesem Spektrum im aliphatischen Bereich auftretende Multiplett bei 1.08 ppm mußte aufgrund seiner Integration, Multiplizität und Kopplungskonstanten einer Ethylgruppe zugeordnet werden.

Ein mit allen experimentellen Ergebnissen übereinstimmender Strukturvorschlag für L-Ala^{21}-R war die Annahme eines N-ethyl-substituierten Amids L-Ala^{21}-NH-CH_2-CH_3 (L-Ala^{21}-NHEt).
Somit wurde Boc-L-Ala-NHEt aus Boc-L-Ala-OH und Ethylamin durch Kupplung nach der DCC-Methode hergestellt. Die Entacylierung erfolgte in üblicher Weise mittels Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1). Das synthetisch hergestellte Produkt und das durch α-chymotryptische Spaltung erhaltene Fragment L-Ala^{21}-NH-CH_2-CH_3 erwiesen sich in sauren, neutralen und basischen dünnschichtchromatographischen Systemen als identisch (Abb. 43).

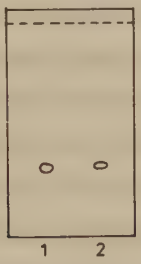


Abb. 43: Dünnschichtchromatogramm (System IV) von nativem (1) und synthetischem (2) H-L-Ala-NH-CH_2-CH_3. Detektion: Ninhydrin.

Der Nachweis eines zusätzlichen D-Alaninrestes in P21, P22 und P22-0 im Vergleich zum Ausgangsprodukt P2 sowie die Identität von L-Ala^{21}-R mit L-Ala-NH-CH_2-CH_3 erlaubte die partielle Formulierung der Strukturen von P21, P22 und P22-0.

P21:

H_3C-CH_2-CO-CO-(2 D-Ala,Gly,L-Phe,L-Asn)-L-Tyr-L-Ala-NHEt

P22:

H_3C-CH_2-CO-CO-(D-Ala,D-Ala,Gly,L-Phe,L-Asn)-L-Tyr-L-Ala-NHEt
(S)

P22-0:

H_3C-CH_2-CO-CO-(D-Ala,D-Ala,Gly,L-Phe,L-Asn)-L-Tyr L-Ala-NHEt
(S)

Zu klären blieb somit die Sequenz des tryptischen Fragments P2, aus dem die Peptide P21, P22, P21(14-20) und P22-0 durch Umsetzung mit Raney-Nickel und zusätzlichen enzymatischen Spaltungen erhalten wurden.

Die Annahme einer weiteren, neben meso-Lanthionin in P2 vorhandenen Thioetherbrücke konnte das Erscheinen eines zusätzlichen D-Alaninrestes bei der Desulfurierung mit Raney-Nickel zwanglos erklären. Auch die Vorstellungen über die Biosynthese Sulfidbrücken enthaltender Antibiotika (vgl. Abschnitt 10.) waren im Einklang mit diesen Überlegungen. Ein möglicher Bindungspartner war die C_β-Methylengruppierung des in P21, P22 und P22-0 nach Entschwefelung auftauchenden Ethylamids. Das durch diese Überlegungen gefundene hypothetische Strukturelement

S-(2-Aminoethyl)-D-cystein (4-Thialysin) (113,114) war in den Hydrolysaten des nativen Antibiotikums sowie in P2 nicht zu detektieren. Substituierte man jedoch in diesem Baustein die Aminoethyl- durch eine Aminovinylgruppierung, so waren alle, das native Antibiotikum sowie P2 betreffenden Daten in Einklang zu bringen.

7.5. Hydrierung von Epidermin und Nachweis von 4-Thialysin

Ziel der durchgeführten Hydrierung des Antibiotikums Epidermin war die Umwandlung des in Abschnitt 7.4. postulierten säurelabilen Bausteins S-(2-Aminovinyl)-D-cystein in den stabileren Baustein S-(2-Aminoethyl)-D-cystein.
Da eine Vergiftung des zur heterogenen Hydrierung verwendeten Edelmetallkatalysators zu befürchten war, wurde die Reaktion zunächst mit Palladium auf Bariumsulfat durchgeführt. Auch nach längerer Inkubation war keine Reaktion zu beobachten.
Eine partielle Umsetzung wurde jedoch mit Palladium auf Aktivkohle erreicht. Nach acht Stunden im Wasserstoffstrom wurde vom Katalysator abzentrifugiert, die überstehende methanolische Lösung verworfen und die Reaktionsprodukte durch mehrmalige Suspension des Katalysators in Eisessig abgelöst (vgl. Abschnitt 6.2.). Die Reinisolierung der durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesenen vier Reaktionsprodukte H1, H2, H3 und H4 gelang unter Verwendung der präparativen Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Abb. 44). Durch Koinjektion von Epidermin mit seinen

Hydrierungsprodukten konnte H2 als unverändertes Antibiotikum identifiziert werden.

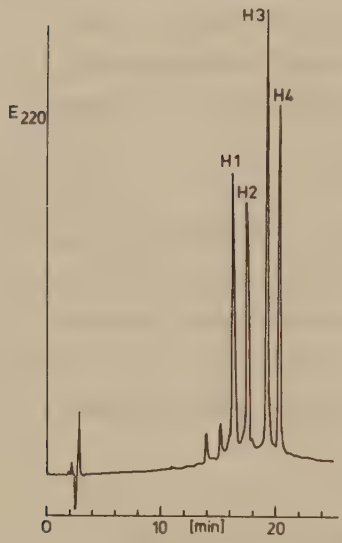


Abb. 44: HPLC-Trennung der Hydrierungsprodukte von Epidermin (Nucleosil 7 C_{18}, 250 x 8 mm). A = Acetonitril/Wasser/TFA (10:90:0.1), B = Acetonitril/Wasser/TFA (70:30:0.1). 10 % B → 70 % B in 30 min, linear. Fluß 4 ml/min.

Die UV-Spektren von H2 (Epidermin) und H4 zeigten das unveränderte langwellige Absorptionsmaximum bei 267 nm, während in H1 und H3 eine Bande bei 277 nm (Tyrosin) auftrat.

Die Aminosäurenanalysen der Totalhydrolysate aller vier Reaktionsprodukte waren unauffällig. Insbesondere konnten keine neuen Bausteine detektiert werden.

Bei der Gaschromatographie der als N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester derivatisierten Totalhydrolysate an chiraler stationärer Phase wurde bei H1 und H3 ein zusätzlicher Peak im Bereich der schwerflüchtigen aromatischen oder basischen Aminosäuren erhalten (Abb. 45). Die Aufnahme der zugehörigen Massenspektren zeigte in beiden Fällen, daß es sich dabei um den

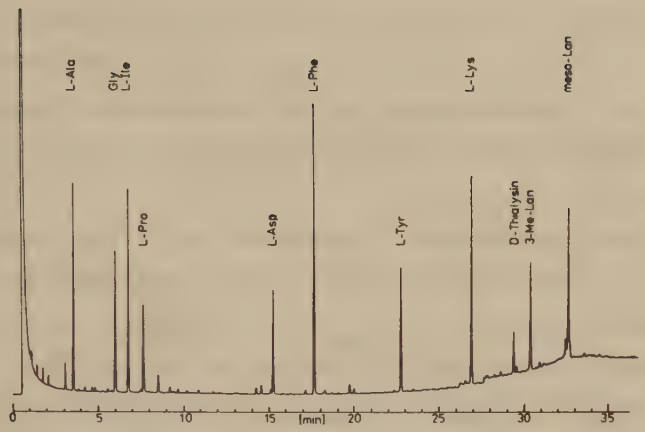


Abb. 45: Gaschromatogramm der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester eines Totalhydrolysats von H1 an Chirasil-Val. T = 80/3/4/200, Trägergas H_2.

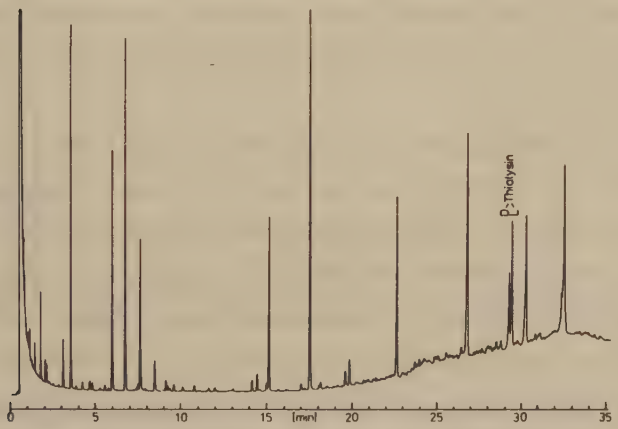


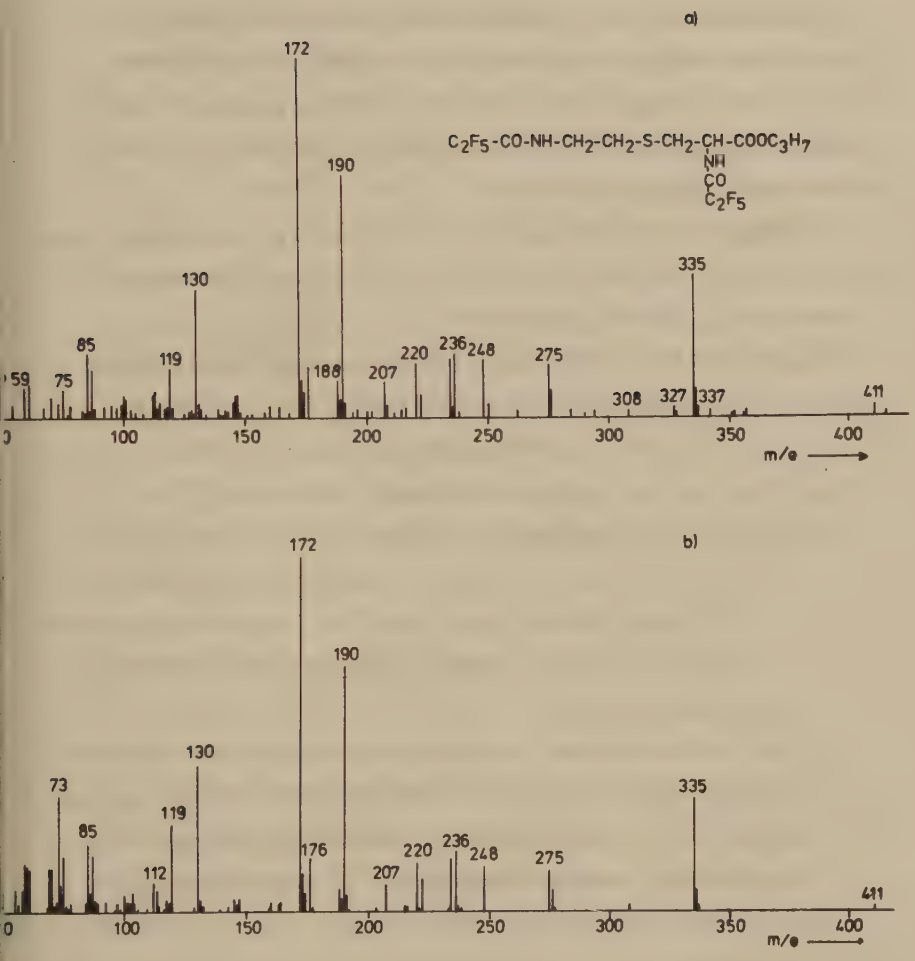
Abb. 47: Koinjektion eines derivatisierten Totalhydrolysats aus H1 mit S-(2-Aminoethyl)-L-cystein. Bed. vgl. Abb. 45.

durch Hydrierung stabilisierten, im nativen Antibiotikum als S-(2-Aminovinyl)-D-cystein postulierten Baustein 4-Thialysin handelte. Auch das Massenspektrum einer synthetischen Probe war identisch mit denen aus den Totalhydrolysaten von H1 und H3 (Abb. 46).

Bei der Aminosäurenanalyse der Hydrolysate von H1 bzw. H3 konnte 4-Thialysin mit dem Routineprogramm nicht detektiert werden, da es zusammen mit Ammoniak eluiert wurde. Die Umsetzung von H3 mit Peroxyameisensäure überführte 4-Thialysin in sein Sulfon, welches aufgrund geringerer Basizität im Aminosäurenanalysator deutlich vom Ammoniakpeak abgetrennt wurde.

Die D-Konfiguration von 4-Thialysin war schon durch das Auftauchen eines zusätzlichen D-Alaninrestes in P21 und P22 bei der Desulfurierung von P2 festgelegt (vgl. Abschnitt 7.2.). Dies konnte durch Koinjektion des derivatisierten Totalhydrolysats von H1 mit synthetischem S-(2-Aminoethyl)-L-cystein bestätigt werden (Abb. 47).

Bei einer unvollständigen Hydrierung von Epidermin sind nur dann vier Produkte zu erwarten, wenn an zwei Positionen im Molekül Reaktionen eintreten. Neben S-(2-Aminovinyl)-D-cystein mußte somit eine weitere reduzierbare Gruppe vorhanden sein, die leider nicht identifiziert werden konnte. Naheliegend wäre die Hydrierung der Doppelbindung der in Position 14 vorhandenen Aminosäure Dehydrobutyrin gewesen. In den Totalhydrolysaten von H1-H4 konnte 2-Aminobuttersäure jedoch weder durch Aminosäurenanalyse noch gaschromatographisch nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang scheint erwähnenswert, daß PATAKI (21) bei



. 46: EI-Massenspektren von a) nativem b) synthetischem S-(2-Aminoethyl)-cystein (Pfp/n-prop-Derivate).

2-Aminobuttersäure enthaltenden Peptiden die Anwendung der alkalischen Totalhydrolyse empfielt. Dieses Verfahren wurde bei den Hydrierungsprodukten jedoch nicht angewandt, da die alkalische Totalhydrolyse auch aus 3-Methyllanthionin 2-Aminobuttersäure freigesetzt hätte.

Eine weitgehende Klärung dieser Problematik wäre durch eine Überprüfung der Molmassen von H1-H4 mittels FD- bzw. FAB-Massenspektrometrie möglich gewesen [+].

Der Nachweis von S-(2-Aminovinyl)-D-cystein als Baustein des nativen Antibiotikums konnte alle bis zu diesem Zeitpunkt offenen chemischen und spektroskopischen Eigenschaften von Epidermin sowie seinem tryptischen Fragment P2 klären:

a) Durch seine Säurelabilität entzog sich S-(2-Aminovinyl)-D-cystein dem Nachweis aus dem sauren Totalhydrolysat des Antibiotikums. Ein geringer Gehalt an Cystein im Hydrolysat von Epidermin stammte jedoch aus dem ungesättigten Baustein (vgl. Abb. 2).

b) Die Blockierung des C-terminalen L-Alaninrestes (Bestandteil von meso-Lanthionin) in Epidermin durch die ε-Aminogruppe von S-(2-Aminovinyl)-D-cystein verhinderte die Methylierung sowie den Angriff der Carboxypeptidasen A, B und Y (vgl. Abschnitt 7.1.).

[+] Da an der Universität Tübingen solche Untersuchungen aus Gründen der Eichung und sonstiger gerätespezifischer Parameter nur bis zur Molmasse 2000 möglich sind, wurden die Proben H1-H4 im Spätsommer 1984 an Herrn Dr. Przybylski, Universität Mainz, abgegeben. Die Resultate stehen leider noch aus.

c) Das langwellige Absorptionsmaximum von Tyrosin bei 277 nm mit seinem Extinktionskoeffizienten ε = 1400 wurde durch die wesentlich höhere Absorption des Thioenolethers (ε = 11 000) bei 267 nm im nativen Antibiotikum sowie in P2 vollständig verdeckt. Die Zerstörung des S-Aminovinyl-chromophors durch Desulfurierung (P21, P22 und ihre Folge-produkte) oder Hydrierung (H1, H3) führte zu dem für Tyrosinpeptide typischen Maximum bei 277 nm.

d) Alle durch FD- und FAB-Spektroskopie ermittelten Molmassen von P2, P21, P22, P21(14-20) und P22-0 waren mit den be-rechneten Werten in Übereinstimmung.

e) Auch die ^{1}H- und ^{13}C-Kernresonanzspektren von Epidermin sowie P2 waren im Einklang mit diesen Ergebnissen (vgl. Abschnitt 5. und Abschnitt 8.).

7.6. Sequenzierung des Peptids P21

7.6.1. Strategie

Zur Sequenzbestimmung des C-terminalen Teils von Epidermin boten sich insbesondere die brückenfreien Peptide P21 und P21(14-20) an (vgl. Abschnitt 7.3.). Ein EDMAN-Abbau war jedoch nicht durchführbar, da beide Strukturen N-terminal mit 2-Ketobutter-säure blockiert waren. Die Sequenz von P21 war zusätzlich C-ter-minal durch Ethylamid blockiert.
Ein möglicher Zugang zur Sequenz von P21 bzw. P21(14-20) bestand in der oxidativen Entfernung der α-Ketoacylgruppierung durch Wasserstoffperoxid. MCGREGOR und CARPENTER konnten in einer 1962

erschienenen Arbeit (115) N-blockierte Modellpeptide in 30-50 proz. Ausbeute in die entsprechenden Sequenzen mit freier Aminogruppe überführen. Trotz exakter Anwendung der Literaturvorschrift (115) auf das Peptid P21(14-20) konnte die α-Ketoacylgruppierung leider nicht entfernt werden.

Bei der Reduktion aller im Peptid P21(14-20) vorhandenen Carbonylgruppen durch Diboran nach BIEMANN et al. (95) wäre die bei Peptiden mit freier Aminogruppe vorangehende N-Acylierung entfallen, da das zu untersuchende Peptid ja bereits blockiert war. Auch die Molmasse des Polyaminoalkohol-O-trimethylsilyl-Derivats von P21(14-20) ließ es einer Untersuchung durch Direkteinlaß-Massenspektrometrie zugänglich erscheinen. Nachteilig bei dieser Methode wäre die aufwendige Derivatisierung sowie dabei auftretende Nebenprodukte, welche insbesondere bei der DE-MS zu Fehlinterpretationen führen könnten.

Die von WEYGAND und PROX eingeführte massenspektrometrische Sequenzanalyse von Peptiden als N-Trifluoracetyl-peptid-methylester (71) kam für die Sequenzierung des Peptids P21(14-20) ebenfalls in Betracht. Durch die im Vergleich zur BIEMANN-Methode niedere Flüchtigkeit der Peptide sowie durch die Blockierung der Struktur P21(14-20) mußte diese Methode auf die Untersuchung von Partialhydrolysaten beschränkt bleiben.

7.6.2. Acidolytische Fragmentierung des Peptids P21

Bevorzugte Angriffspunkte bei acidolytischen Spaltungen sollten die α-Ketoacylgruppierung sowie die C- und N-terminale Amidbindung des in den Sequenzen P21 und P21(14-20) enthaltenen Asparaginrestes sein. Die Säurelabilität dieser Bindung in Proteinen war schon seit 1950 bekannt (116) und gilt auch für Aspartylreste bei Alkalibehandlung. So berichten GÖHRING und JUNG (117) über eine hohe Labilität der Asp-Gly-Bindung bei der hydrazinolytischen Ablösung des Secretinsegments 3-8 vom PEG-Träger.
Bei der Bestätigung der Struktur des aus 28 Aminosäuren bestehenden Polypeptids Thymosin α_1 war die acidolytische Spaltung am Aspartylrest mit Erfolg angewandt worden (118).
In Pilotversuchen wurde zunächst die Säurelabilität des beide Schwefelbrücken enthaltenden C-terminalen Bruchstücks P2 abgetastet. Das Erhitzen von P2 mit 0.1 N HCl auf 80 °C für 10 h konnte keine Peptidbindung spalten, sowohl die Dünnschichtchromatographie als auch die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zeigten fast ausschließlich das unveränderte Ausgangsmaterial. Eine Erhöhung der Temperatur auf 90 °C bei gleichzeitiger Verlängerung auf 16 h brachte das Ausgangsmaterial fast völlig zum Verschwinden. In den Dünnschichtchromatogrammen dieser Hydrolysate war neben weniger ninhydrinpositiver Flecken nur noch eine Spur P2 mit Chlor/TDM anfärbbar, ein wichtiger Hinweis auf die Säurelabilität des α-Ketopyruvylrestes.
Präparative Spaltungen des Heptapeptids P21 wurden schließlich mit 0.1 N HCl bei 93 °C und einer Inkubationszeit von 16 h

durchgeführt. Im Dünnschichtchromatogramm waren nur wenige, ninhydrinpositive Spaltprodukte zu detektieren (Abb. 48).

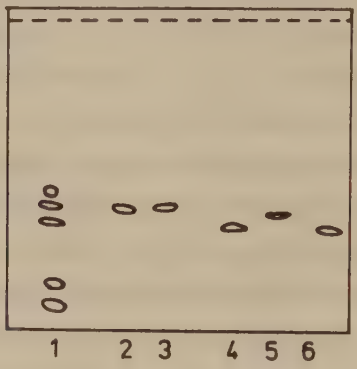


Abb. 48: Dünnschichtchromatogramm (System IV) der Acidolyse von P21 (1). 2 = D-Ala-L-Phe (nat.), 3 = D,L-Ala-D,L-Phe (syn.), 4 = Gly-D-Ala-L-Phe (nat.), 5 = Gly-L-Phe-L-Ala (syn.), 6 = Gly-L-Ala-L-Phe (syn.). Detektion: Ninhydrin.

Die Isolierung präparativer Mengen der zur Sequenzbestimmung notwendigen Fragmente gelang durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Abb. 49).

Die Aminosäurenanalyse des an der Umkehrphase RP 18 zuerst eluierten Fragments zeigte ein Tripeptid mit der Zusammensetzung Ala (2), Tyr (1) an. Die gaschromatographische Trennung des derivatisierten Totalhydrolysats ergab D- und L-Alanin im Verhältnis 1:1, die FD-Massenspektrometrie eine Molmasse von 350. Es handelte sich offensichtlich um ein C-terminales Bruchstück aus P21, dessen Sequenz durch die in Abschnitt 7.3. beschriebenen enzy-

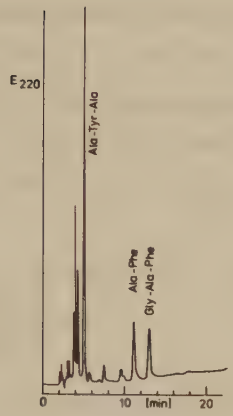


Abb. 49: Semipräparative Trennung eines Partialhydrolysats von P21 (Nucleosil 7 C_{18}, 250 x 8 mm). Mobile Phase: Acetonitril (15 %), Wasser (85 %), TFA (0.1 %). Fluß 4 ml/min.

matischen Spaltungen festgelegt werden konnte:

H-D-Ala-L-Tyr-L-Ala-NHEt Tripeptid (19-21)

Weitere, durch acidolytische Spaltung und präparative HPLC aus P21 isolierte Fragmente waren ein Dipeptid mit der Zusammensetzung Ala (1), Phe (1) und ein Tripeptid, bestehend aus Gly (1), Ala (1), Phe (1). Da beide aus dem N-terminalen Bereich von P21 stammen mußten, wurde zunächst ihre Reaktion mit Ninhydrin überprüft. Das Dipeptid konnte unter Rotfärbung detektiert werden, während das Tripeptid unter Gelbfärbung nachzuweisen war. Die Endgruppenbestimmung mittels Dansylchlorid (81) zeigte für das Dipeptid N-terminales Alanin an, während für das Tripeptid Glycin

als N-terminale Aminosäure identifiziert werden konnte. Da in dem isolierten C-terminalen Tripeptid D- und L-Alanin im Verhältnis 1:1 nachgewiesen wurde, mußte der in den N-terminalen Spaltprodukten von P21 gefundene Alaninrest D-konfiguriert sein (vgl. Abschnitt 7.2.). Die Sequenz dieser Fragmente lautete somit:

D-Ala-L-Phe	Dipeptid (16-17)
Gly-D-Ala-L-Phe	Tripeptid (15-17)

Eine zusätzliche Absicherung wurde durch Kochromatographie dieser nativen Isolate mit den synthetischen Produkten D,L-Ala-D,L-Phe, Gly-L-Phe-L-Ala und Gly-L-Ala-L-Phe an Kieselgel 60 Dünnschichtplatten mit dem System IV erhalten. D,L-Ala-D,L-Phe und D-Ala-L-Phe bzw. Gly-L-Ala-L-Phe und Gly-D-Ala-L-Phe waren bezüglich Anfärbung und ihrer R_F-Werte identisch (Abb. 48).

Ein Vergleich der Sequenzen der identifizierten Di- und Tripeptide mit der in Abschnitt 7.4. ermittelten Partialstruktur von P21 zeigte, daß somit nur noch die Position des L-Asparaginrestes festgelegt werden mußte. Mögliche Alternativen waren die Position 15 (auf 2-Ketobuttersäure folgend) bzw. die Position 18 zwischen den beiden isolierten Tripeptiden.
Ein FAB-Massenspektrum von P21 war nicht zu erhalten. Die Einordnung von L-Asparagin in Position 18 der Sequenz gelang jedoch durch FAB-Massenspektrometrie am enzymatisch geöffneten Peptid P22-0 (vgl. Abschnitt 7.3.). Die aus der N-terminalen Fragmentierungsserie (vgl. Abschnitt 6.5.) stammenden Ionen bei m/e = 710, 639 und 525 bewiesen eindeutig die sukzessive Abspaltung

von Tyrosin, Alanin und Asparagin aus dem Muttermolekül P22-0 (Abb. 50).

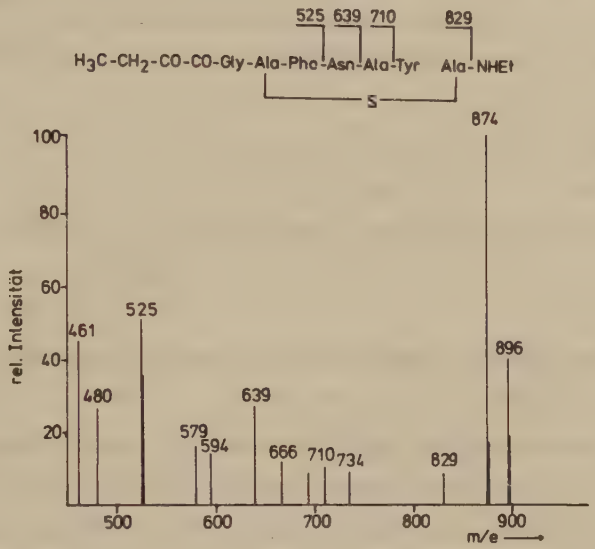


Abb. 50: ⊕ -FAB-Massenspektrum des Peptids P22-0 (Glycerin-Matrix).

Diese Fragmentierung legte gleichzeitig die Position der in P22-0 vorhandenen meso-Lanthioninbrücke fest, da dieses Fragmentierungsschema nur bei einer Thioetherbrücke ausgehend von D-Ala^{16} zu interpretieren war. Ihre Lage wird im nächsten Abschnitt auch durch chemische Methoden nachgewiesen. Die vollständigen Sequenzen der Peptide P21, P22, P21(14-20) und P22-0 konnten somit festgelegt werden.

H_3C-CH_2-CO-CO-Gly-D-Ala-L-Phe-L-Asn-D-Ala-L-Tyr-L-Ala-NHEt P21

S

H_3C-CH_2-CO-CO-Gly-D-Ala-L-Phe-L-Asn-D-Ala-L-Tyr-L-Ala-NHEt P22

H_3C-CH_2-CO-CO-Gly-D-Ala-L-Phe-L-Asn-D-Ala-L-Tyr P21(14-2

S

H_3C-CH_2-CO-CO-Gly-D-Ala-L-Phe-L-Asn-D-Ala-L-Tyr L-Ala-NHEt P22-0

7.7. Zuordnung der Thioetherbrücken im tryptischen Fragment P2

Läßt man das FAB-Spektrum von P22-0 (Abb. 50) für die Zuordnung des zu meso-Lanthionin gehörenden D-Alaninrestes einmal außer Betracht, so wären sowohl D-Ala^{16} als auch D-Ala^{19} in Betracht zu ziehen. Die im N-terminalen Bruchstück P1 angewandte Kombination von EDMAN-Abbau, enzymatischen Spaltungen und FAB-Massenspektrometrie (vgl. Abschnitt 6.7.) konnte bei den C-terminalen, Thioetherbrücken enthaltenden Peptiden P2, P22 und P22-0 nicht angewandt werden, da ihre N- und C-Termini blockiert waren.

Eine mögliche Strategie bestand in der Isolierung geeigneter Sequenzen aus einem Partialhydrolysat von P22. Peptid P22 unterscheidet sich von dem zur Sequenzierung verwandten Peptid P21 nur durch die in ihm enthaltene meso-Lanthioninbrücke (siehe oben).

Die Acidolyse des Peptids P22 wurde unter den gleichen Bedingungen (0.1 N HCl, 16 h, 93 °C) wie für P21 durchgeführt. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte ebenfalls nur

wenige, ninhydrinpositive Spaltprodukte an (Abb. 51).

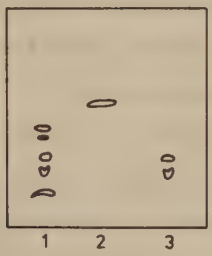


Abb. 51: Dünnschichtchromatogramm (System IV) des Partialhydrolysats von P22. 1 = Hydrolysat, 2 = Ausgangsprodukt, 3 = Rechromatographie von P22-1 und P22-2. Det. Ninhydrin.

Durch präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie konnte aus dem Partialhydrolysat eine einheitlich erscheinende Fraktion isoliert werden (Abb. 52).

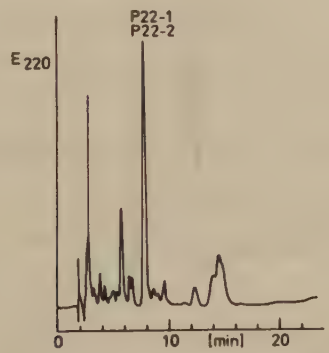


Abb. 52: Isolierung der P22-1 und P22-2-haltigen Fraktion aus dem Partialhydrolysat von P22. Säule: Nucleosil 7 C_{18}, 250 x 8 mm. Mobile Phase: Acetonitril (22 %), Wasser (78 %), TFA (0.1 %). Fluß 4 ml/min.

Ihre Rechromatographie an Kieselgel 60 Dünnschichtplatten mit dem System IV zeigte jedoch zwei mit Ninhydrin detektierbare Peptide an (Abb. 51). Die Aminosäurenanalyse des Gemisches ergab für meso-Lanthionin, Tyrosin, Phenylalanin und Alanin molare Verhältnisse, für Glycin jedoch nur 50 % im Vergleich zu den oben angeführten Aminosäuren. Offensichtlich war nur eines der beiden Peptide glycinhaltig, da ja auch bei der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Spaltung von P21 ein Dipeptid (Ala-Phe) ohne und ein Tripeptid (Gly-Ala-Phe) mit Glycin in annähernd gleichen Verhältnissen isoliert wurde (vgl. Abschnitt 7.6.).

Die Reinisolierung beider Peptide gelang durch Modifikation des bei der präparativen HPLC verwandten Elutionssystems (30) (Abb. 53).

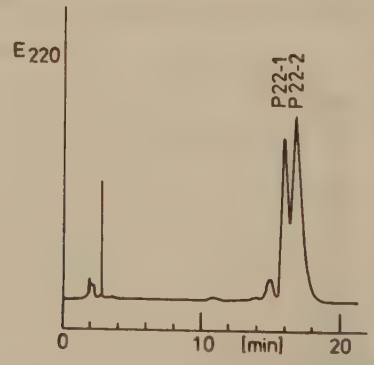
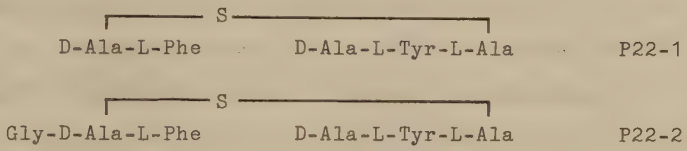


Abb. 53: Trennung von P22-1 und P22-2 an Nucleosil 7 C_{18} (250 x 8 mm). Mobile Phase: Acetonitril (20 %), Wasser (80 %), H_3PO_4 (0.1 %), 0.01 M $NaClO_4$. Fluß 4 ml/min.

Das hydrophilere Spaltprodukt besaß die Aminosäurenzusammensetzung meso-Lan (1), Tyr (1), Phe (1), Ala (1). Ein diese Aminosäuren enthaltendes Fragment konnte bei der vorliegenden Sequenz von P21 (vgl. Abschnitt 7.6.) nur unter der Voraussetzung einer von D-Ala^{16} ausgehenden meso-Lanthioninbrücke erhalten werden:



7.8. Differenzierung zwischen Asparagin und Asparaginsäure

Alle in den bisherigen Abschnitten des Kapitels 7. abgehandelten Strukturen des tryptischen Fragments P2 sowie seiner Folgeprodukte wurden scheinbar willkürlich mit Asparagin formuliert. Ein deutlicher Hinweis auf Asparagin in der Sequenz von P2 war bereits der Ammoniakgehalt in den Totalhydrolysaten der zur Strukturaufklärung von P2 hergestellten Peptide. Diese aus den Aminosäurenanalysen stammenden Werte mußten jedoch sehr vorsichtig und differenziert beurteilt werden, da in den Strukturen mit intaktem S-(2-Aminovinyl)-D-cystein (z.B. P2) bei der Totalhydrolyse auch aus dem Thioenolether Ammoniak freigesetzt wurde. Die durch präparative HPLC isolierten Fragmente eigneten sich ebenfalls nicht zur Bestimmung von Ammoniak, da ihre Werte in jedem Falle zu hoch lagen.

Geeignete Proben zur Beurteilung des Ammoniakgehaltes waren die durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 gereinigten Peptide P21 und P22. In ihren Totalhydrolysaten wurde ein annähernd äquimolarer Gehalt an Ammoniak nachgewiesen.

Verbindungen mit freier Carboxygruppe unterscheiden sich von den entsprechenden Amiden in ihrer Molmasse um eine Einheit. Die durch FD- und FAB-Massenspektrometrie ermittelten Molmassen von P2, P21, P21(14-20) und P22-O waren nur beim Einbeziehen von Asparagin in ihre Sequenzen korrelierbar. Auch das FAB-Massenspektrum von P22-O (Abb. 50) zeigte durch die Fragmentierung m/e = 639 auf m/e = 625 (Δ = 114) das Vorliegen von Asparagin an.

Die Abwesenheit einer freien Carboxygruppe wurde zusätzlich durch die negative Reaktion des nativen Antibiotikums bzw. P2 mit Diazomethan nachgewiesen. Nach langer Inkubation wurden zwar Spuren von lipophileren Verbindungen dünnschichtchromatographisch erfaßt, diese stammten aber mit Sicherheit aus Nebenreaktionen (Addition an vorhandene Doppelbindungen, Methylierung von Tyrosin).

Alle im Abschnitt 7. durchgeführten Untersuchungen waren nur mit der in Abb. 54 wiedergegebenen Struktur des aus tryptischer Spaltung entstandenen Fragments P2 zu vereinbaren.

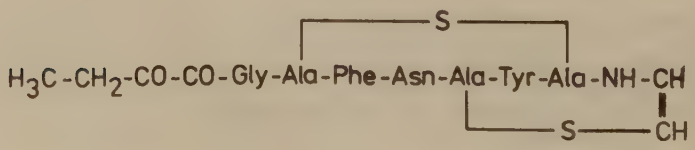


Abb. 54: Struktur des tryptischen Fragments P2 aus Epidermin.

7.9. Schematische Zusammenfassung der Strukturaufklärung von P2

Schema 3 zeigt eine kurze, abschließende Zusammenfassung über die Strukturaufklärung des C-terminalen tryptischen Fragments von Epidermin .

7.10. Die Primärstruktur von Epidermin

Die formale Substitution der P2 N-terminal blockierenden 2-Ketobuttersäure durch die im nativen Antibiotikum vorhandene Aminosäure Dehydrobutyrin und eine anschließende Fragmentkondensation der tryptischen Peptide P1 und P2 führte direkt zu der in Abb. 55 dargestellten Gesamtsequenz des heterodet tetracyclischen Peptidantibiotikums Epidermin.

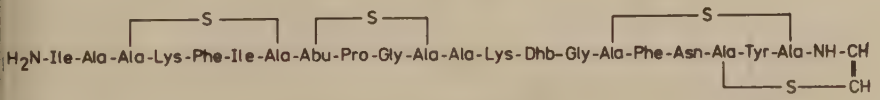
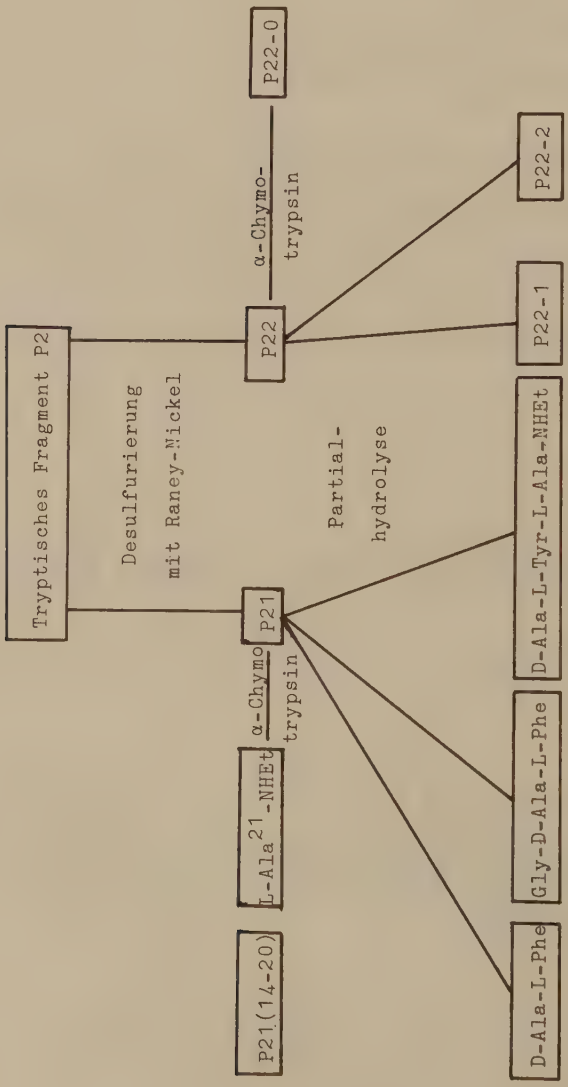


Abb. 55: Primärstruktur von Epidermin. Die dem N-Terminus näherstehenden Hälften der einzelnen Thioetheraminosäuren sind jeweils D-konfiguriert.

Schema 3: Übersicht über die Strukturaufklärung des tryptischen Fragments P2 aus Epidermin.



Eine eindrucksvolle, jedoch ungewöhnliche Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Arbeit an Epidermin bietet das in Abb. 56 enthaltene Diagramm, in dem die Molmassen der identifizierten Bausteine gegen den zeitlichen Verlauf der Strukturaufklärung aufgetragen wurde. In der dem Diagramm entnehmbaren Reihenfolge wurden zunächst die Proteinaminosäuren, dann meso-Lanthionin bzw. 2S,3S,6R-3-Methyllanthionin, Dehydrobutyrin, D-Alanin und Ethylamin sowie schließlich S-(2-Aminovinyl)-D-cystein als in Epidermin vorhandene Bausteine identifiziert.

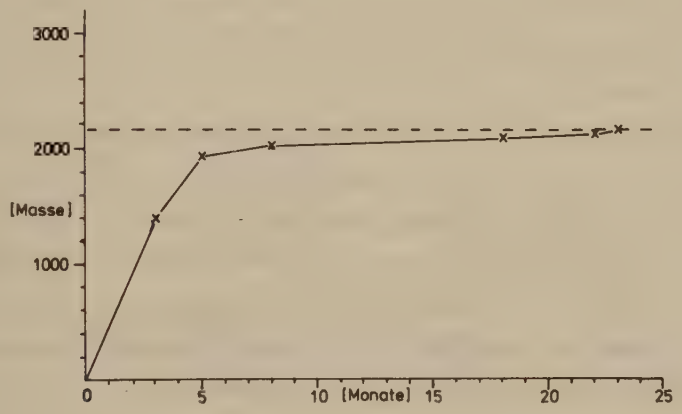


Abb. 56: Diagramm identifizierte Molmasse aus Epidermin gegen den zeitlichen Verlauf der Strukturaufklärung.

8. KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE UND CIRCULARDICHROISMUS

8.1. ^{13}C-Kernresonanzspektroskopie

Die ^{13}C-NMR-Spektren von Epidermin sowie seinen tryptischen Fragmenten P1 und P2 waren im Zusammenhang mit der damals noch unbekannten Komponente S-(2-Aminovinyl)-D-cystein im Abschnitt 5.1. diskutiert worden. In den Abbildungen 57-59 sind die gespreizten Carbonyl-, Aromaten- und Aliphatenbereiche dieser Spektren nochmals wiedergegeben. Beim Vergleich der einzelnen Abschnitte der Spektren muß eine Lösungsmittelverschiebung berücksichtigt werden, da das Spektrum von P1 wegen zu geringer Löslichkeit nicht in Dimethylformamid sondern in ^{12}C,^{2}H-Dimethylsulfoxid angefertigt wurde.

Die Signalzuordnungen, welche aufgrund begrenzter Meßmöglichkeiten nur durch Vergleich mit literaturbekannten Daten (119,120) erhalten wurden, sind in Tabellen 4-6 aufgeführt. Allerdings sei erwähnt, daß von den anderen bekannten Vertretern der schwefelhaltigen heterodet cyclischen Peptidantibiotika bisher überhaupt keine ^{13}C-Spektren existieren. Im Zeitalter der zweidimensionalen Kernresonanztechniken erscheint ein solches Vorgehen zur Signalzuordnung als nicht mehr dem Stand der Wissenschaft entsprechend. In vielen Bereichen des ^{13}C-Spektrums des nativen Antibiotikums mußte deshalb auf eine genauere Zuordnung verzichtet werden.

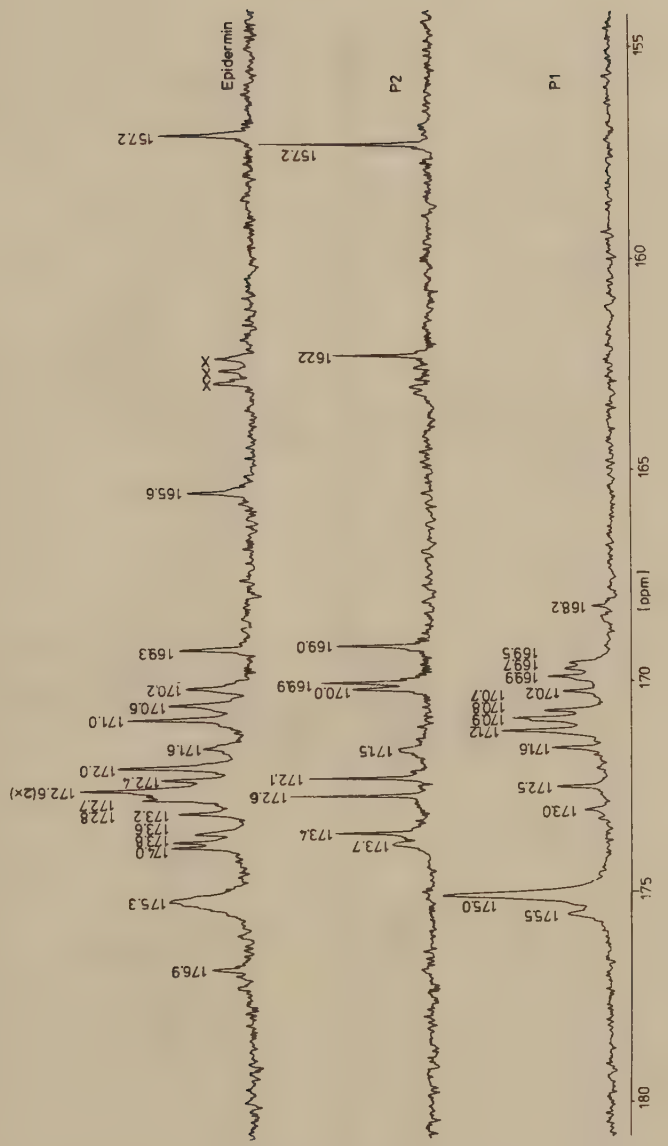


Abb. 57: Gespreizte ^{13}C-Kernresonanzspektren von Epidermin, P2 und P1, Carbonylbereich (Bed. vgl. S. 41).

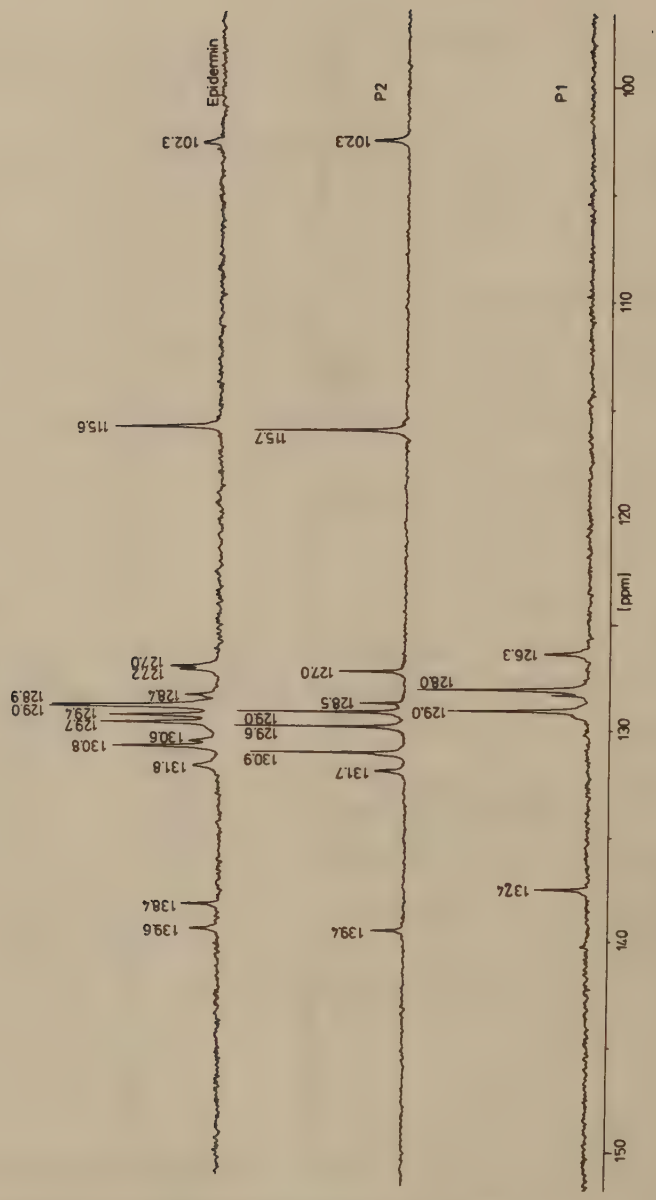


Abb. 58: Gespreizte ^{13}C-Kernresonanzspektren von Epidermin, P2 und P1, Aromatenbereich (Bed. vgl. S. 41).

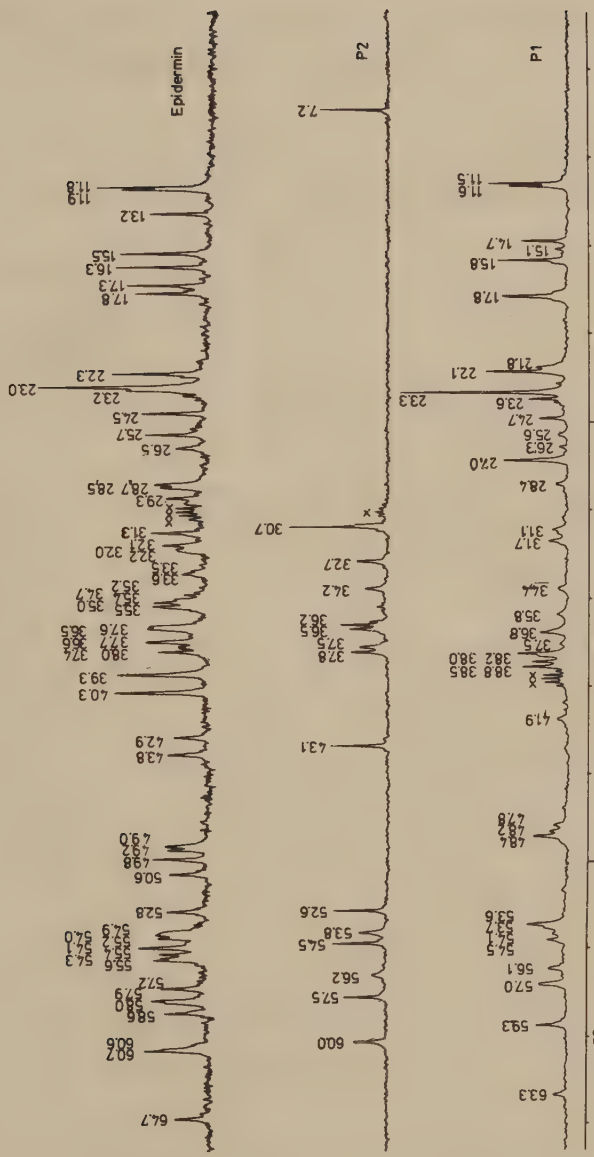


Abb. 59: Gespreizte ^{13}C-Kernresonanzspektren von Epidermin, P2 und P1, Aliphatenbereich (Bed. vgl. S. 41).

Tab. 4: ^{13}C-NMR-Signale von Epidermin, P1 und P2 im Carbonylbereich (ohne Zuordnung, vgl. Abschnitt 5.1.).

Epidermin (DMF)		P2 (DMF)		P1 (DMSO)	
176.9		173.7		175.5	
175.3		173.4	Asn (2)	175.0	
174.0	Asn (2)	172.6	Lan (2)	173.0	Pro(1)
173.8	Pro (1)	172.1	Gly (1)	172.5	Lan (2)
173.6	3-Me-Lan (2)	171.5	Tyr (1)	171.6	3-Me-Lan (2)
173.2	Lan (4)	170.0	Phe (1)	171.2	Gly (1)
172.8	Gly (2)	169.9	V-Cys (1)	170.9	Ala (2)
172.7	Ala (2)	169.0		170.8	Ile (2)
172.6	Ile (2)			170.7	Phe (1)
172.6	Tyr (1)			170.2	Lys (2)
172.4	Phe (2)			169.9	Acetat (1)
172.0	Lys (2)			169.7	
171.6	V-Cys (1)			169.5	
171.0	Acetat (1)			168.2	
170.6					
170.2					
169.3					
165.6	Dhb-CO	162.2	Pyruvyl-CO		
		199.5	Pyruvyl-C_α		

Tab. 5: ^{13}C-NMR-Signale von Epidermin, P1 und P2 im Aromatenbereich (vgl. Abschnitt 5.1.).

Epidermin (DMF)	P2 (DMF)	P1 (DMSO)
157.2 Tyr-C'4	157.2 Tyr-C'4	
139.6 Phe-C'1	139.4 Phe-C'1	137.4 Phe-C'1
138.4 Phe-C'1		
131.8 V-Cys-C_ε	131.7 V-Cys-C_ε	
130.8 Tyr-C'2,C 6	130.9 Tyr-C'2,C'6	
130.6 Dhb		
129.7 Phe-C'2,C 6	129.6 Phe-C'2,C'6	
129.4 Phe-C'2,C 6		
129.0 Phe-C'3,C 5	129.0 Phe-C'3,C'5	129.0 Phe-C'2,C'6
128.9 Phe-C'3,C 5		
128.4 Tyr-C'1	128.5 Tyr-C'1	128.0 Phe-C'3,C'5
127.2 Phe-C'4		
127.0 Phe-C'4	127.0 Phe-C'4	126.3 Phe-C'4
115.6 Tyr-C'3,C 5	115.7 Tyr-C'3,C'5	
102.3 V-Cys-C_δ	102.3 V-Cys-C_δ	

Tab. 6: Versuch zur teilweisen Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale von Epidermin, P1 und P2 im Aliphatenbereich (vgl. Abschnitt 5.1.).

Epidermin (DMF)	P2 (DMF)	P1 (DMSO)
64.7		63.3 Pro-C_α
60.7		
60.6	60.0 Tyr-C_α	
58.6		59.3 Ile-C_α
58.0		
57.9	57.5 Phe-C_α	
57.2		57.0 Ile-C_α
55.6	56.2 V-Cys-C_α	56.1 Phe-C_α
55.4		
55.2		54.5
54.9		54.1 Lan-C_α (2x)
54.3	54.5 Lan-C_α	53.7 3-Me-Lan-C_α
54.1		53.6
54.0	53.8 Lan-C_α	
52.8	52.6 Asn-C_α	
50.6		
49.8		
49.2		48.4
49.0		48.2 Ala-C_α (2x)
43.8		47.8 Lys-C_α (2x)
42.9	43.1 Gly-C_α	41.9 Gly-C_α
40.3		
39.3		
38.0	37.8 Asn-C_β	38.8 Lys-C_ε
37.7	37.5 Tyr-C_β	
37.6		38.5 Lys-C_ε
37.4		38.2 Ile-C_β
36.6	36.5 Phe-C_β	38.0 Ile-C_β
36.5	36.2 Lan-C_β	37.5 Phe-C_β
		36.8 Lan-C_β

Fortsetzung Tab. 6

Epidermin (DMF)	P2 DMF)	P1 (DMSO)
35.5		35.8 Lan-C_β
35.4		
35.2		
35.0		
34.7	34.2 Lan-C_β	34.4 3-Me-Lan-C_β
33.6		
33.5		
32.2	32.7 V-Cys-C_β	
32.1		
32.0		31.7 Lys-C_β
31.3	30.7 Pyruvyl-C_β	31.1 Lys-C_β
29.3		
28.7		28.4 Pro-C_β
28.5		27.0 Lys-C_δ
26.5		26.3 Lys-C_δ
25.7		25.6 Pro-C_γ
24.5		24.7 Ile-$C_{\gamma 1}$
23.2		23.6 Ile-$C_{\gamma 2}$
23.0		23.3 Acetat
22.3		22.1 Lys-C_γ
17.8		21.8 Lys-C_γ
17.3		17.8 Ala-C_β (2x)
16.3		15.8 3-Me-Lan-CH_3
15.5		15.1 Ile-$C_{\gamma 2}$
13.2		14.7 Ile-$C_{\gamma 2}$
11.9		11.6 Ile-C_δ
11.8	7.2 Pyruvyl-C_γ	11.5 Ile-C_δ

8.2. Konfiguration der in Epidermin enthaltenen Doppelbindungen

Die in Epidermin vorhandenen ungesättigten Aminosäuren Dehydrobutyrin und S-(2-Aminovinyl)-D-cystein können als Z- oder E-Isomere auftreten. Eine Unterscheidung zwischen beiden Konfigurationen ist durch eine genaue Analyse des ^{1}H-Kernresonanzspektrums von Epidermin (vgl. Abb. 20) möglich.

Das Dublett der Methylgruppe von Dehydrobutyrin erscheint bei δ = 1.7 ppm, während das Quartett von CH_β bei 6.44 ppm zu finden ist. Die Kopplungskonstante beträgt 6.9 Hz.

Die Analyse der ^{1}H-Spektren einer Reihe von dehydrobutyrinhaltigen Modellverbindungen ergibt folgende Resultate (121):

Die Lage des Vinylprotons von Z- und E-Isomerem unterscheidet sich je nach Verbindung um 0.1-0.3 ppm, hängt aber auch stark von den verwendeten Schutzgruppen der Aminofunktion ab. Die Lage des Dubletts der Methylgruppe scheint dagegen ein zuverlässiger Indikator für die Z/E-Isomerie zu sein. Z-Isomere absorbieren bei 1.7 ppm, während bei E-Isomeren das Dublett bei 2.05 ppm auftritt. Die Signallage der Methylgruppe der in Epidermin vorhandenen Dehydroaminobuttersäure spricht für das Vorliegen eines Z-Isomeren.

Die Kopplungskonstante von 7.25 Hz zwischen den beiden Vinylprotonen in S-(2-Aminovinyl)-D-cystein ist in Übereinstimmung mit einer Z-konfigurierten Doppelbindung, da $J_{H,H}$ Z(cis)-konfigurierter ungesättigter Systeme im Bereich von 7-10 Hz liegt (87).

8.3. Circulardichroismus

8.3.1. Optisch aktive Übergänge von Thiolen und Sulfiden

Aliphatische Sulfide zeigen im UV-Spektrum drei für den Schwefel charakteristische Banden. Die längstwellige, sehr schwache Bande ist vom C-S-C-Winkel abhängig; sie erscheint in offenkettigen Sulfiden bei ungefähr 240 nm und erfährt eine Rotverschiebung bis 265 nm in Episulfiden. Die zweite relativ schwache Bande liegt bei ungefähr 220 nm und die stärkere kurzwellige Bande bei ungefähr 200 nm. Die Bande bei 240 nm wird einem magnetisch erlaubten Übergang eines Elektrons des 3 p_z-Orbitals des Schwefels in ein antibindendes Molekülorbital zugeschrieben. Die Bande bei 220 nm entspricht ebenfalls dem erlaubten Übergang aus dem 3 p_z-Orbital in ein antibindendes MO, während die Bande bei 200 nm auf eine Anregung dieses Elektrons in ein 3 d-Orbital zurückzuführen ist (122).

Viele optisch aktive Sulfide wurden mit Hilfe der Optischen Rotationsdispersion (ORD) untersucht (123,124). Da jedoch die ORD-Spektren immer die Summe aller im Molekül vorhandenen optisch aktiven Elektronenübergänge widerspiegeln, lassen sich Informationen über den Schwefel leichter aus den Circulardichroismus (CD)-Spektren erhalten, bei denen die beobachteten Cotton-Effekte im wesentlichen Übergängen der im UV-Bereich absorbierenden einzelnen Chromophore entsprechen (125). Bei Thiolen und Sulfiden kann optische Aktivität immer nur dann auftreten, wenn sich in der Nachbarschaft des Schwefels asymmetrische Gruppen befinden, wie bei den schwefelhaltigen Aminosäuren. Ihre chiroptischen Eigenschaften wurden von JUNG et al. (126) ausführlich untersucht.

8.3.2. CD-Spektren Schwefel enthaltender, heterodet cyclischer Peptide

8.3.2.1. Chiroptische Eigenschaften von Nisin

Für circulardichroitische Messungen standen sowohl hochreines Nisin von ERHARD GROSS als auch HPLC-reines Epidermin aus unseren eigenen Aufarbeitungen zur Verfügung.
Die Sekundärstruktur beider Moleküle kann nicht durch ihre CD-Spektren aufgeklärt werden, da die Cotton-Effekte der Peptidbindungen in der Wellenlängenregion unterhalb 250 nm mit Schwefelbanden interferieren. Eine weitere Schwierigkeit bei der Ableitung der Backbone-Konformation ergibt sich durch die irreguläre Sequenz von Aminosäuren mit R- und S-Konfiguration an ihren C_α-Atomen (meso-Lanthionin bzw. 2S,3S,6R-3-Methyllanthionin).

Die Beiträge der aromatischen Aminosäuren Histidin (Nisin), Tyrosin (Epidermin) und der Dehydroaminosäuren Dehydroalanin und Dehydrobutyrin sollten vernachlässigbar sein. Alle Cotton-Effekte in dieser Region müssen somit den Schwefelübergängen thioetherhaltiger Aminosäuren zugeordnet werden. Neben der Interpretation dieser Banden konnten durch Aufnahmen in diversen Lösungsmitteln Aussagen über die Flexibilitäten beider Moleküle erhalten werden.
Die Wahl geeigneter Lösungsmittel für spektroskopische Studien an Nisin wird limitiert durch die geringe Löslichkeit des Antibiotikums in neutralen Solventien. Das Peptid löst sich jedoch in ausreichenden Mengen in vielen Lösungsmitteln durch Zugabe einiger Tropfen 1 N HCl. Diese Säurezugabe verursacht allerdings

drastische spektrale Änderungen (Abb. 60). Die Lösung von Nisin in reinem Methanol zeigt zwei negative Cotton-Effekte bei 255 und 228 nm. Die Addition eines Tropfens 1 N HCl zu dieser Lösung ergibt eine merkliche Blauverschiebung des längerwelligen Cotton-Effektes. Die Bande bei kürzeren Wellenlängen wird durch die Säurezugabe stärker beeinflußt. Ihr Maximum verschiebt sich nach Wellenlängen unterhalb 210 nm, die Überlappung beider Cotton-Effekte verschwindet vollständig.

In Hexafluoraceton-Sesquihydrat wird ein kleiner, langwelliger Cotton-Effekt mit negativem Vorzeichen durch eine Bande bei 234 nm mit positivem Vorzeichen begleitet (Abb. 61). In reinem Trifluorethanol (Abb. 61) folgt einem sehr kleinen positiven Cotton-Effekt bei 267 nm ein negativer bei 246 nm. Eine weitere positive Bande befindet sich bei 232 nm.

Die Werte für die molaren Elliptizitäten der CD-Extrema von Nisin in den verschiedenen Solventien sind in Tab. 7 enthalten.

Die chiroptischen Effekte des Nisins sind deshalb besonders ausgeprägt, weil außer Methionin-21 alle schwefelhaltigen Aminosäuren in kleine Ringstrukturen eingebaut sind. Es ist durch viele Beispiele bekannt, daß die Einführung optisch aktiver Chromophore in unbewegliche Ringstrukturen zu einem Anwachsen der Elliptizitäten der Cotton-Effekte im Vergleich zur optischen Aktivität in offenkettigen Strukturen führt (125). Der interessanteste Befund in den CD-Spektren von Nisin war die Position der Cotton-Effekte bei Wellenlängen von 250-260 nm. Cotton-Effekte von Sulfiden werden üblicherweise zwischen 235 und 255 nm beobachtet. In freien schwefelhaltigen Aminosäuren liegen die Schwefelüber-

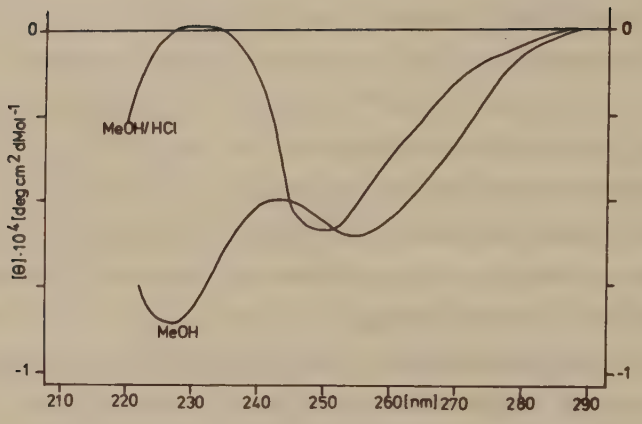


Abb. 60: CD-Spektren von Nisin in Methanol bzw. Methanol plus 1 Tropfen 1 N HCl/3 ml CH_3OH (23 °C, 2.86 mMol).

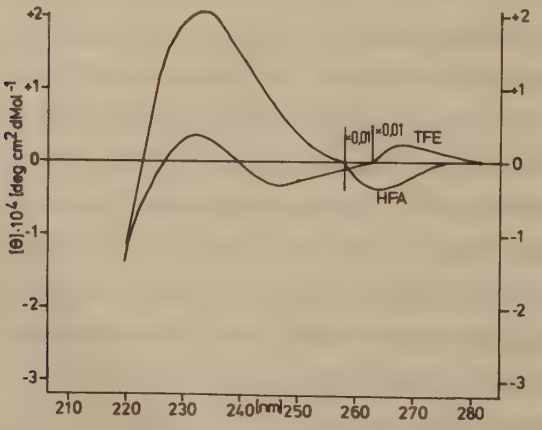


Abb. 61: CD-Spektren von Nisin in Trifluorethanol und Hexafluoraceton-Sesquihydrat (23 °C, 2.86 mMol).

gänge bei 230 nm (126). Cotton-Effekte bei längeren Wellenlängen werden speziell in Episulfiden gefunden. Der Grad der Planarität der Umgebung des Schwefelatoms ist offensichtlich verantwortlich für die Position des Schwefelübergangs mit geringster Energie. Der langwellige Cotton-Effekt in Nisin zeigt, daß einige der schwefelhaltigen Ringe in annähernd planarer Konformation vorliegen könnten. Der Einfluß der Protonierung auf die Lage dieses Cotton-Effektes (vgl. Abb. 60) legt den Schluß nahe, daß der planarere Teil des Moleküls in der Region des bicyclischen Rings 23-28, welcher in Position 27 einen protonierbaren Histidinrest enthält, ausgebildet wird. Dies wurde auch durch eine theoretische Konformationsstudie des bicyclischen Teils von Nisin bestätigt (55).
Die starken Unterschiede in den CD-Spektren von Nisin in Methanol, Trifluorethanol und Hexafluoraceton-Sesquihydrat deuten auf erhebliche konformative Änderungen des Antibiotikums in unterschiedlichen Lösungsmitteln hin.

8.3.2.2. CD-Spektren von Epidermin

Die CD-Spektren von Epidermin in Methanol, Methanol/HCl, Trifluorethanol und Hexafluoraceton-Sesquihydrat (Abb. 62) zeigen im Vergleich zu denen von Nisin drastische Unterschiede. Die Lage und Elliptizität der Cotton-Effekte von Nisin waren durch Solvenseffekte stark beeinflußbar. In Epidermin dagegen sind keine signifikanten Änderungen zu beobachten. Auch die Elliptizitäten beider Antibiotika differieren bis um den Faktor 10 (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Molare Elliptizitäten der CD-Extrema von Nisin und Epidermin in verschiedenen Lösungsmitteln (T = 23 °C).

Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]	$[\theta]_\lambda$ Nisin [$degcm^2dMol^{-1}$]
Methanol	255	-6000
	243	-5000
	227	-8650
Methanol/HCl	248	-4125
	232	0
Hexafluoraceton-	263	- 385
Sesquihydrat	234	+20790
Trifluorethanol	267	+230
	248	-3465
	232	+3465

Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]	$[\theta]_\lambda$ Epidermin [$degcm^2dMol^{-1}$]
Methanol	269	+22300
	246	-66000
	218	+105000
Methanol/HCl	270	+18400
	246	-75600
	221	+116400
Hexafluoraceton-	266	+19400
Sesquihydrat	240	-56200
Trifluorethanol	265	+17400
	241	-62000
	215	+67900

Die starken Banden mit positivem Vorzeichen bei 270 nm in den Spektren von Epidermin stammen offensichtlich aus der C-terminalen bicyclischen Thioenolstruktur, da ihr UV-Maximum in diesem Bereich lag. Die negative Bande bei 245 nm sowie der positive Cotton-Effekt bei 220 nm waren wie die langwellige Bande durch unterschiedliche Solventien nur geringfügig beeinflußbar.

Die starke Dominanz der C-terminalen bicyclischen Thioetherbrücken in Epidermin auf die Lage und Intensität der Cotton-Effekte zeigt Abb. 63, in der die CD-Spektren des nativen Antibiotikums sowie seiner Spaltprodukte P1, P21 und P22 (vgl. Abschnitt 6., 7.) enthalten sind. Alle Spektren wurden von methanolischen Lösungen aufgenommen. Die sukzessive Entfernung der Thioetherbrücken durch enzymatische und chemische Methoden macht sich durch eine starke Abnahme der Elliptizitäten der entsprechenden Spaltstücke bemerkbar.
Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß Epidermin im Gegensatz zu Nisin eine relativ rigide Konformation besitzt.

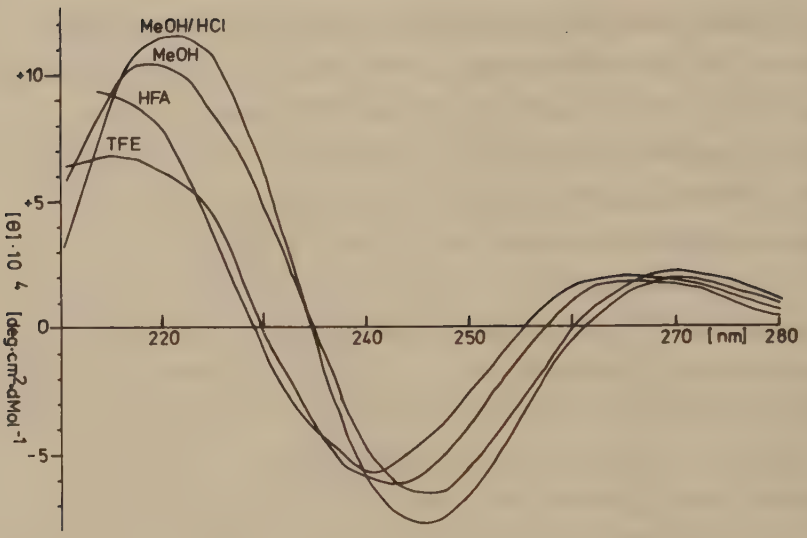


Abb. 62: CD-Spektren von Epidermin in Methanol, Methanol plus 1 Tropfen 1 N HCl/3 ml CH_3OH, Hexafluoraceton-Sesquihydrat und Trifluorethanol (23 °C, 0.36 mMol).

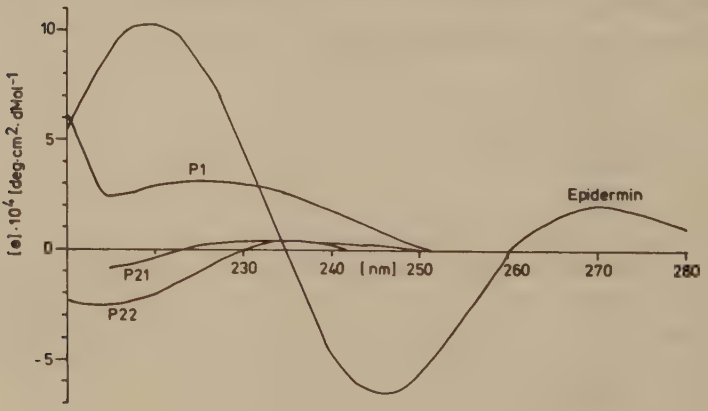


Abb. 63: CD-Spektren von Epidermin (0.36 mMol), P1 (0.42 mMol), P21 (0.55 mMol) und P22 (0.68mMol) in Methanol (23 °C).

9. BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN SCHWEFELHALTIGER, HETERODET CYCLISCHER PEPTIDE

9.1. Biologische Charakterisierung von Nisin und Subtilin

Neben den antibiotischen Wirkungen von Nisin und Subtilin auf grampositive Mikroorganismen wurden von GROSS et al. weitere biologische Aktivitäten beobachtet:

Nisin zeigt antimalarische Aktivität, wahrscheinlich verursacht durch den Entzug des Parasiten von der durch den Wirtsorganismus notwendigen Versorgung mit Coenzym A (44).
Nisin verursacht die in vitro-Freisetzung lysosomaler Enzyme aus der Membran (45).
Nisin sowie Fragmente des Antibiotikums induzieren die fötale Resorption bei Ratten und verhindern die Implantation des Ovums (53).

Die antibiotische Aktivität beider Polypeptide scheint eng mit der Struktur ihrer C-Termini verknüpft, da mit der acidolytischen Abspaltung des C-terminalen Dehydroalanyllysins als Pyruvyllysin die Aktivität gegen Staphylococcus aureus verschwindet (44).

Nisinase, ein spezifisches Enzym aus Bacillus cereus ist der wichtigste Nisin-Antagonist. Nach Arbeiten von JARVIS et al. (127) ist das Enzym als eine Dehydropeptid-Reduktase einzuordnen, da es die in Nisin vorhandenen α,β-ungesättigten Aminosäuren hydriert und das Antibiotikum dadurch inaktiviert.

Mechanistische Aspekte der antibiotischen Wirkung von Nisin und Subtilin wurden bislang wenig beachtet. GROSS et al. führten diese Effekte auf die Blockierung cysteinhaltiger Enzyme zurück, deren SH-Gruppen irreversibel an die Doppelbindungen der Dehydroaminosäuren gebunden werden (44).
Nach HAMMES et al. greift Nisin in vitro in die Mureinsynthese ein (128).

9.2. Biologische Charakterisierung von Epidermin

9.2.1. Wirkungsspektrum im Vergleich zu Nisin, Erythromycin und Fusidinsäure

Der Vergleich der antibiotischen Wirkung von Nisin und Epidermin zeigte, daß die Hemmwirkung beider Antibiotika fast ausschließlich auf grampositive Mikroorganismen beschränkt war. Nisin und Epidermin hatten die gleichen Organismen als Wirkungsschwerpunkte, Epidermin zeigte jedoch in vielen Fällen niedrigere MHK-Werte (12).
Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung wurde ein Wirkprofil gegen klinisch relevante Keime erstellt (Tab. 8)[+]. Zum Vergleich wurden die bereits erfolgreich in die klinische Praxis eingeführten Antibiotika Erythromycin und Fusidinsäure getestet. Beide werden bei Infektionen durch grampositive Erreger eingesetzt.

[+]Für die MHK-Wert-Bestimmung danke ich herzlich Herrn Dr. Werner, Fa. Thomae (Biberach).

Tab. 8: Minimale Hemmkonzentrationen von Epidermin (A), Erythromycin (B) und Fusidinsäure (C) für klinisch relevante Keime in Mikrotiterplatten.

Mikroorganismen	MHK (µg/ml) (A)	(B)	(C)
Bacillus fragilis (Bonn)	>128	2	1
Bacillus fragilis (Köln)	>128	4	2
Corynebacterium xerosis NCTC 9755	0,125	≤0,06	0,125
Escherichia coli ATCC 9637	128	64	>128
Escherichia coli ATCC 11775	128	64	>128
Micrococcus luteus ATCC 9341	≤0,06	≤0,06	0,5
Micrococcus luteus ATCC 15957	0,25	>128	0.5
Peptostreptococcus anaerobicus	0,5	0,06	0,25
Propionibacterium acnes ATCC 25746	0,25	≤0,03	1
Propionibacterium acnes IF 31002	2	0,06	1
Propionibacterium acnes PC 904	0,06	0,06	0,5
Pseudomonas aeruginosa BC 19	>128	64	>128
Staphylococcus aureus E 88	4	>128	0,125
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	2	0,125	0,25
Staphylococcus epidermidis WG 99	2	0,5	4
Streptococcus pneumoniae ATCC 6302	2	0,03	16
Streptococcus pyogenes ATCC 8668	0,125	0,03	1

9.2.2. Biologische Aktivität der aus dem nativen Antibiotikum gewonnenen Derivate

Die durch enzymatische und anschließende chemische Umsetzungen erhaltenen Bruchstücke P1, P21 und P22 zeigten im Plattendiffusionstest gegen den empfindlichen Indikatorkeim Micrococcus luteus keine antibiotische Aktivität. Das C-terminale Bruchstück P2 wurde wegen seiner Unlöslichkeit in wässrigen Medien nicht untersucht.

Interessante antibiotische Eigenschaften zeigten die durch Hydrierung der nativen Struktur enstandenen Produkte H1, H2 (Epidermin), H3 und H4. Alle Komponenten waren im Plattendiffusionstest gegen Micrococcus luteus aktiv (Tab. 9). Es bestand eine direkte Proportionalität zwischen der Größe der Hemmhöfe und der Hydrophilie der getesteten Verbindungen. Es war mit dieser Testreihe nicht abzuschätzen, ob das Produkt H1 aktiver war als seine Ausgangsstruktur, da der größere Hemmhof auch durch bessere Diffusion (Hydrophilie) verursacht werden konnte. Eine Entscheidung ist erst nach der MHK-Bestimmung von H1 und Epidermin im Flüssigmedium möglich.

Tab. 9: Hemmhöfe (mm) der Hydrierungsprodukte H1-H4 von Epidermin im Plattendiffusionstest gegen Micrococcus luteus (je 10 µg).

H1	16.5	H2	14.0
H3	11.0	H4	10.5

Obwohl die Hydrierungsprodukte in ihrer Struktur noch nicht völlig aufgeklärt waren (vgl. Abschnitt 7.5.), konnte somit der Nachweis geführt werden, daß die Hydrierung von S-(2-Aminovinyl)-D-cystein in H1 und H3 die antibiotische Aktivität nicht aufhebt. Von besonderem Interesse wäre in diesem Zusammenhang die Einwirkung des Enzyms Nisinase auf Epidermin (vgl. Abschnitt 9.1.).

9.2.3. Lymphozyten-Proliferation

Epidermin wurde in einem Lymphozyten-Proliferationstest auf mögliche hemmende oder stimulierende Eigenschaften untersucht (129). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Wirkungen von Epidermin auf Lymphozyten.

10. BIOSYNTHESE PEPTIDISCHER WIRKSTOFFE

10.1. Einleitung

Die Biosynthese von Peptidantibiotika durch Mikroorganismen erfolgt auf zwei voneinander unabhängigen Wegen.
Peptidische Wirkstoffe, welche nichtribosomal an Multienzymsystemen aufgebaut werden, zeichnen sich durch ihren Gehalt an ungewöhnlichen Bausteinen wie modifizierte Aminosäuren, Fettsäuren, Chromophore oder Zucker aus. Beispiele für nichtribosomal synthetisierte Peptidantibiotika sind die Bacitracine (130), Gramicidine (131), Tyrocidine (132), Alamethicine (133) und Iturine (134). Die in diesen Wirkstoffen meist ausgeprägte Mikroheterogenität beschränkt sich nicht auf den Austausch von Aminosäuren in den Sequenzen, auch die Zusammensetzung nichtpeptidischer Kompnenten, wie z.B. Fettsäuren, kann erheblich variieren (85).
Ribosomal synthetisierte Peptide und Proteine weisen naturgemäß keine Mikroheterogenität auf. Viele dieser Peptide werden jedoch kovalenten Modifikationen unterworfen, nachdem sie aus den Ribosomen freigesetzt wurden. Bekannte Beispiele sind enzymkatalysierte, reversible Phosphorylierungen der Seitenketten von Serin, Threonin und Tyrosin und Glycosylierungen von Lysin in Proteinen (135). Komplexere enzymkatalysierte Modifikationen sind die Umwandlung von Prolin zu Hydroxyprolin im endoplasmatischen Reticulum (136) sowie die Bildung von γ-Carboxyglutamat aus Glutaminsäure (137). Enzymatische posttranslationale Umwandlungen finden auch bei der Biosynthese von Lipoproteinen wie z.B. bei dem Braunschen

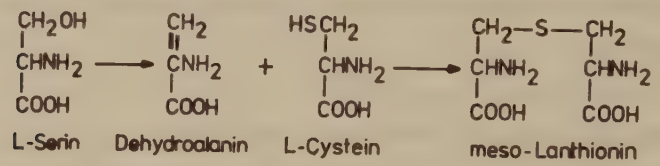
Lipoprotein aus der äußeren Zellmembran von E. coli statt (138). Diese Prozesse sind auch insbesondere im Hinblick auf den Einschub und Durchtritt von Proteinen durch Membranen während ihrer Synthese von Bedeutung.

10.2. Biosynthese Lanthionin- und 3-Methyllanthionin-haltiger Antibiotika

Nisin und Subtilin enthalten neben den L-konfigurierten Proteinaminosäuren insgesamt je acht Aminosäuren mit selteneren Strukturen, davon 1 Rest Lanthionin, 4 Reste 3-Methyllanthionin und drei α,ß-ungesättigte Aminosäuren, Dehydroalanin (2) sowie Dedydrobutyrin (1) (45,50). Diese Aminosäurenzusammensetzung stand zunächst in scheinbarem Widerspruch zu einer von HURST 1966 veröffentlichten Arbeit, bei der die Biosynthese von Nisin durch Streptococcus lactis mit Inhibitoren der ribosomalen Biosynthese von Proteinen (Chloramphenicol, Puromycin) gehemmt werden konnte (139).

Drei Jahre später wurde durch den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren L-Cystein, L-Threonin sowie L-Serin als Vorstufen der schwefelhaltigen Aminosäuren Lanthionin und 3-Methyllanthionin erkannt (140). Der vorgeschlagene Biosyntheseweg geht von einem ribosomalen Aufbau einer L-Threonin, L-Serin und L-Cystein enthaltenden Vorläufersequenz (Precursor) aus, in der die Hydroxyaminosäuren enzymatisch dehydratisiert und in einem zweiten Schritt die nucleophile SH-Gruppe von Cystein an die Doppelbindung addiert wird (Abb. 64). Dieser Prozess verläuft unter Inversion der Konfiguration am C_α-Atom der Precursoraminosäuren L-Serin und L-Threonin,

da an ihren Positionen die D-konfigurierten Alanin- bzw. α-Aminobuttersäurereste von meso-Lanthionin bzw. 2S,3S,6R-3-Methyllanthionin in den nativen Antibiotika auftauchen. Ein weiterer, enzymkatalysierter Reaktionsschritt besteht in der Abspaltung des vorgebildeten Antibiotikums aus der Vorläufersequenz.



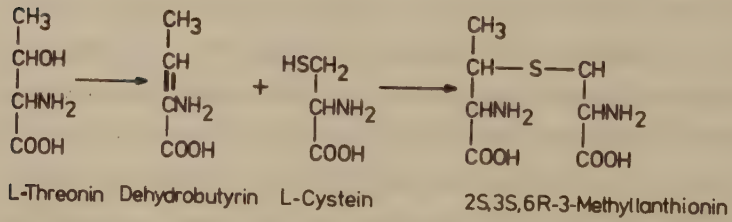


Abb. 64: Biosynthese von Lanthionin und 3-Methyllanthionin.

Über diese Biosyntheseschritte konnte auch das Auftreten der ungesättigten Aminosäuren Dehydroalanin und Dehydrobutyrin erklärt werden, da sie, ebenfalls aus Serin und Threonin entstanden, keinen nucleophilen Additionspartner in der Nisin- bzw. Subtilin-Sequenz mehr vorfanden. Das Auftreten von Lysinoalanin in Cinnamycin und Duramycin bewies, daß auch die ε-Aminogruppe von Lysin ein geeignetes Nucleophil war (53).

In den siebziger Jahren wurden diese Annahmen über die Biosynthese von Nisin durch weitere Arbeiten untermauert. HURST isolierte basische Peptide aus einer nichtproduzierenden Mutante von Streptococcus lactis und versetzte diese mit einem Zellextrakt des Wildtyps. Die in vitro Bildung von Nisin wurde durch Bioessay nachgewiesen (141,142).
Einer japanischen Arbeitsgruppe gelang es 1983, Vorläufermoleküle von Subtilin durch immunologische Methoden zu isolieren (143). Ausgangspunkt war ein Antiserum aus Kaninchen gegen ein Konjugat aus Subtilin und Hemocyanin (KLH), aus dem die Antikörper-Subtilin-Komplexe durch Protein A-Sepharose gefällt wurden. Die Gelchromatographie des Immunopräzipitats an Sephadex G-50 trennte drei radioaktiv markierte Vorläufermoleküle mit den Molmassen 8000, 5000 und 4000 ab.

10.3. Ableitung von Teilsequenzen der Precursorproteine aus den Strukturen der nativen Antibiotika

Die Bestimmung der Position der in meso-Lanthionin bzw. 2S,3S,6R-3-Methylllanthionin enthaltenen D-Aminosäurereste in den Sequenzen von Epidermin, Nisin und Subtilin ließ unter dem von verschiedenen Arbeitsgruppen experimentell abgesicherten Biosynthesemechanismus (139-143) eine Rücktranslation der Strukturen der nativen Antibiotika in ihre Vorläufersequenzen zu. Die den N-Termini der einzelnen Strukturen näherstehenden Hälften der Thioether waren jeweils D-konfiguriert (43-50).

Die Ableitung der Precursor-Sequenzen von Nisin und Subtilin (Abb.65) bereitete keine Schwierigkeiten, bei Epidermin mußte zunächst noch die biosynthetische Herkunft der in der C-terminalen Hälfte des Moleküls vorhandenen Aminosäure S-(2-Aminovinyl)-D-cystein erklärt werden (vgl. Abschnitt 7.8.). Bei einer enzymatischen Spaltung der C-terminalen Peptidbindung in der cyclisierten, thioetherhaltigen Vorläufersequenz von Epidermin wäre eine zweite, vollständige meso-Lanthioninbrücke entstanden (Abb.66). Die Spaltung der endständigen C_α-CO-Bindung ergab dagegen den ungesättigten Baustein S-(2-Aminovinyl)-D-cystein. Diese ungewöhnliche Fragmentierung an C_α wäre bei der enzymatischen Abspaltung des fertig ausgebildeten, nativen Antibiotikums aus dem Precursor möglich gewesen, eine zweite Variante bestände in der nachträglichen enzymatischen Decarboxylierung der komplett vorliegenden Epidermin-Struktur.

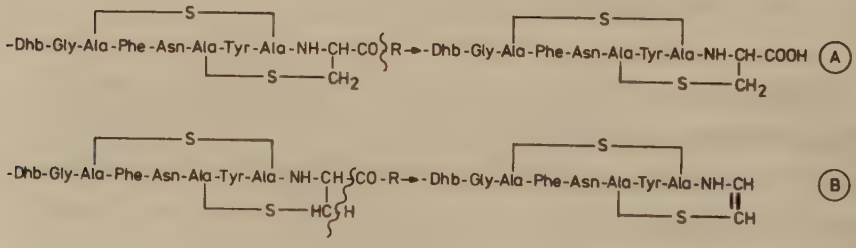


Abb. 66: Biosynthese einer vollständigen (A) oder unvollständigen (B) meso-Lanthioninbrücke in Epidermin. Weg (B) führt zur Bildung von S-(2-Aminovinyl)-D-cystein.

Nisin

```
                5                  10                  15
Ile-Thr-Ser-Ile-Ser-Leu-Cys-Thr-Pro-Gly-Cys-Lys-Thr-Gly-Ala-Leu-

            20                  25                  30
Met-Gly-Cys-Asn-Met-Lys-Thr-Ala-Thr-Cys-His-Cys-Ser-Ile-His-Val-

Ser-Lys
```

Subtilin

```
                5                  10                  15
Trp-Lys-Ser-Glu-Ser-Leu-Cys-Thr-Pro-Gly-Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Leu-

            20                  25                  30
Gln-Thr-Cys-Phe-Leu-Gln-Thr-Leu-Thr-Cys-Asn-Cys-Lys-Ile-Ser-Lys
```

Epidermin

```
                5                  10                  15
Ile-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Cys-Thr-Pro-Gly-Cys-Ala-Lys-Thr-Gly-Ser-

            20
Phe-Asn-Ser-Tyr-Cys-Cys
```

Abb. 65: Ausschnitte aus den Sequenzen der Precursor von Nisin, Subtilin und Epidermin (abgeleitet aus den Strukturen der nativen Antibiotika).

Die Produzenten der heterodet cyclischen Peptidantibiotika Nisin (Streptococcus lactis), Subtilin (Bacillus subtilis) und Epidermin (Staphylococcus epidermidis) zeigen morphologisch gesehen keine größere Verwandtschaft, trotzdem besitzen alle drei Ausschnitte aus den Vorläufersequenzen große Homologien in ihren N-terminalen Bereichen. Die Rücktranslation der Vorläufersequenzen in ihren genetischen Code (Abb.67) zeigt eine große Übereinstimmung der DNA-Sequenzen von Nisin und Epidermin sowie Nisin und Subtilin, insbesondere unter Berücksichtigung möglicher Punktmutationen (Austausch einer Base des Tripletts) in der DNA.

10.4. Strategien zur Suche nach Vorläufersequenzen von Epidermin

Die im Vergleich zu den bekannten heterodet cyclischen Peptiden ungewöhnliche Struktur des bicyclischen, C-terminalen Teils von Epidermin läßt die Suche nach möglichen Vorläuferproteinen in einem besonderen Licht erscheinen, da Nisin, Subtilin, Cinnamycin und Duramycin jeweils Lysin als C-terminale Aminosäure in ihren Strukture enthalten. Dieses basische Zentrum wirkt offensichtlich als Codon bei der enzymatischen Abspaltung der nativen Antibiotika aus ihren Vorläufern.
Das Screening auf Vorläufersequenzen von Epidermin kann mit verschiedenen Ansätzen erfolgen:

a) Der direkte immunologische Weg führt über die Bildung von Antikörpern gegen das native, thioetherhaltige Antibiotikum. Im Falle von Subtilin konnten durch dieses Vorgehen drei Vor-

Subtilin

TrpLysSerGluSerLeuCysThrProGlyCysValThrGlyAlaLeuGlnThrCysPheLeuGlnThrLeuThrCysAsnCysLysIleSerLys

```
UGGAAAAGCGAAAGCUUAUGCACACCAGGAUGCGUAACAGGAGCAUUACAAACAUGCUUCUUACAAACAUUAACAUGCAACUGCAAAAUAAGCAAA
   AAGAGUGAGAGUUUGUGUACCCCCGGCUGUGUCACGGGCGCCUUGCAGACCUGUUUUUUGCAGACCUUGACCUGUAAUUGUAAGAUCAGUAAG
      UCA   UCACUA   ACGCCGGGG   GUGACCGGGGCGCUA   ACG      CUA   ACGCUAACG          AUUUCA
      UCC   UCCCUC   ACUCCUGGU   GUUACUGGUGCUCUC   ACU      CUC   ACUCUCACU            UCC
      UCG   UCGCUG                          CUG            CUG     CUG               UCG
      UCU   UCUCUU                          CUU            CUU     CUU               UCU
```

Nisin

IleThrSerIleSerLeuCysThrProGlyCysLysThrGlyAlaLeuMetGlyCysAsnMetLysThrAlaThrCysHisCysSerIleHisValSerLys

```
AUAACAAGCAUAAGCUUAUGCACACCAGGAUGCAAAACAGGAGCAUUAAUGGGAUGCAACAUGAAAACAGCAACAUGCCACUGCAGCAUACACGUAAGCAAA
AUCACCAGUAUCAGUUUGUGUACCCCCGGCUGUAAGACCGGCGCCUUG   GGCUGUAAU   AAGACCGCCACCUGUCAUUGUAGUAUCCAUGUCAGUAAG
AUUACGUCAAUUUCACUA   ACGCCGGGG      ACGGGGGCGCUA   GGG           ACGGCGACG        UCAAUU   GUGUCA
   ACUUCC   UCCCUC   ACUCCUGGU      ACUGGUGCUCUC   GGU           ACUGCUACU        UCC      GUUUCC
      UCG   UCGCUG                        CUG                                    UCG        UCG
      UCU   UCUCUU                        CUU                                    UCU        UCU
```

Epidermin

IleAlaSerLysPheIleCysThrProGlyCysAlaLysThrGlySerPheAsnSerTyrCysCys

```
AUAGCAAGCAAAUUCAUAUGCACACCAGGAUGCGCAAAAACAGGAAGCUUCAACAGCUACUGCUGC
AUCGCCAGUAAGUUUAUCUGUACCCCCGGCUGUGCCAAGACCGGCAGUUUUAAUAGUUAUUGUUGU
AUUGCGUCA      AUU   ACGCCGGGG   GCG   ACGGGGUCA      UCA
   GCUUCC           ACUCCUGGU   GCU   ACUGGUUCC       UCC
      UCG                                 UCG         UCG
      UCU                                 UCU         UCU
```

Abb. 67: Nucleotid-Sequenzen der Precursor von Subtilin, Nisin und Epidermin (Ausschnitte, abgeleitet aus den nativen Antibiotika)

läufermoleküle aufgefunden werden (143). Durch die Ausbildung der Schwefelbrücken unterscheiden sich die Konformationen des nativen Antibiotikums und des eigentlichen Vorläufers beträchtlich, so daß bei diesem Vorgehen die Erfassung von Biosynthesestufen, welche vorgebildete Schwefelbrücken enthalten, als wahrscheinlich erscheint.

b) Die Rücktranslation der Struktur des nativen Antibiotikums in seine Precursorsequenz (vgl.Abb.65) bietet die Möglichkeit, Antikörper gegen die gesamte oder gegen einen Teil der nach der Festphasenmethode synthetisierten Vorläufersequenzen zu erhalten. Die Auswahl antigener Determinanten wird seit einiger Zeit durch Computerprogramme zur Epitopsuche und Konformationsvorhersage stark erleichtert. In den Abb. 68-70 sind die mit diesen Programmen (144-150) ermittelten Daten der Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von α-Helix, β-Faltblatt und β-Turn sowie die Werte für Hydrophilie, Hydropathie und Acrophilie der Vorläufersequenzen von Epidermin, Nisin und Subtilin enthalten. Ein gemeinsames Epitop stellt der β-Turn Thr-Pro-Gly-Cys (8-11) dar. Ein monoklonaler Antikörper gegen diese Sequenz sollte ein Screening auf Precursor aller drei Antibiotika ermöglichen.

c) Eine weitere Möglichkeit zur Precursorsuche von Epidermin besteht in der Isolierung basischer Peptide aus dem abzentrifugierten, aufgeschlossenen Zellmaterial des Produzenten Staphylococcus epidermidis. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biosynthese von Subtilin besteht in der Abspaltung des fertig ausgebildeten Antibiotikums aus dem Precursor (143). Bei einer vergleichbaren Biosynthese von Subtilin und Epidermin besteht somit die Wahrscheinlichkeit, Vorläufermoleküle in größeren Mengen zu erfassen.

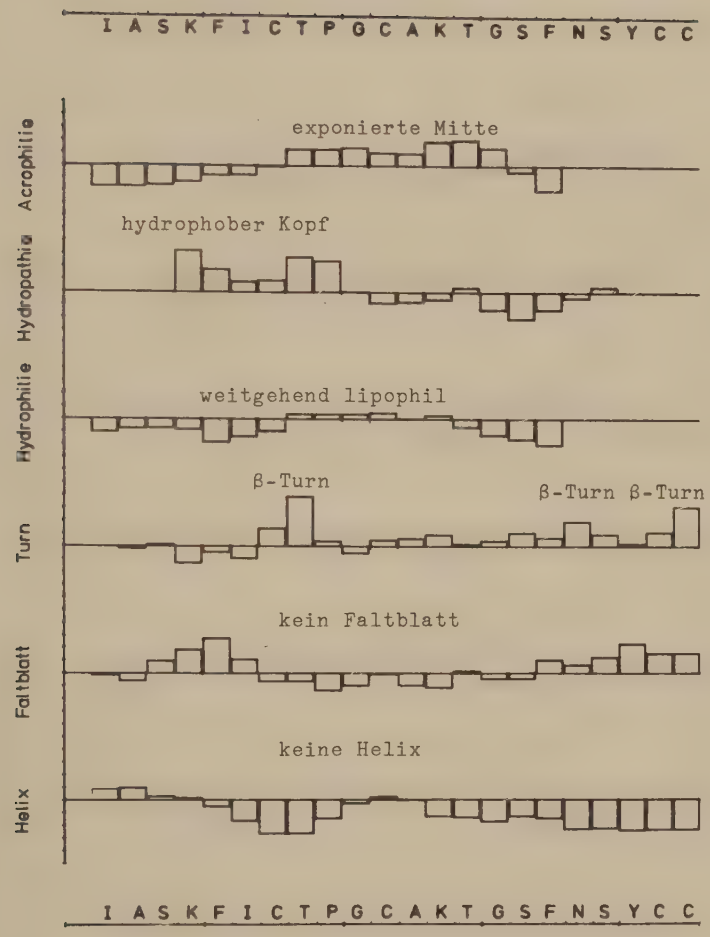


Abb. 68: Sekundärstrukturanalyse der aus dem nativen Antibiotikum abgeleiteten Vorläufersequenz von Epidermin.

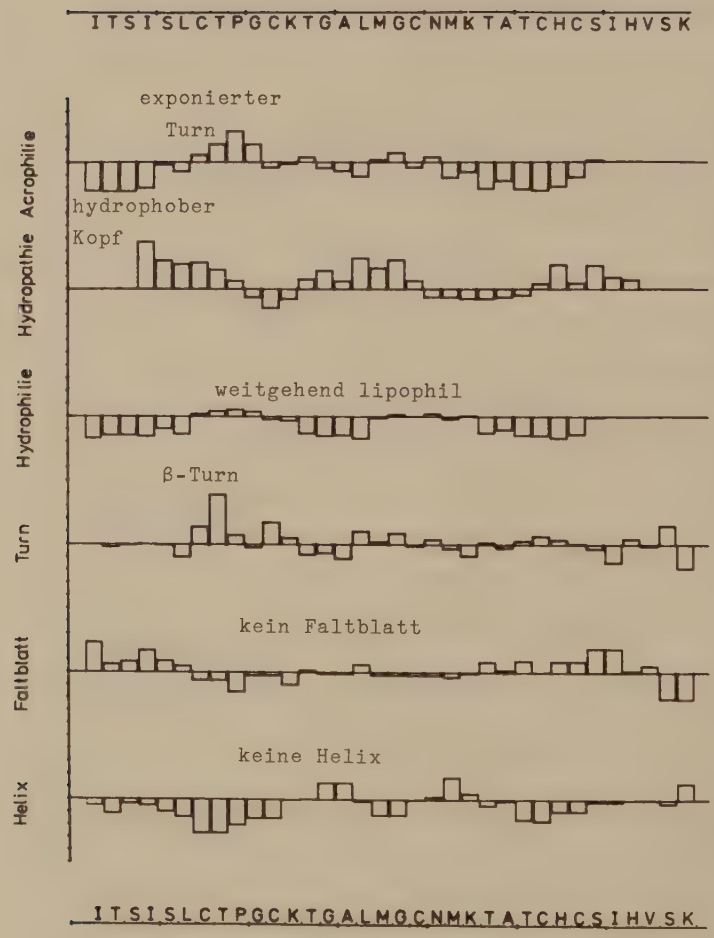


Abb. 69: Sekundärstrukturanalyse der aus dem nativen Antibiotikum abgeleiteten Vorläufersequenz von Nisin.

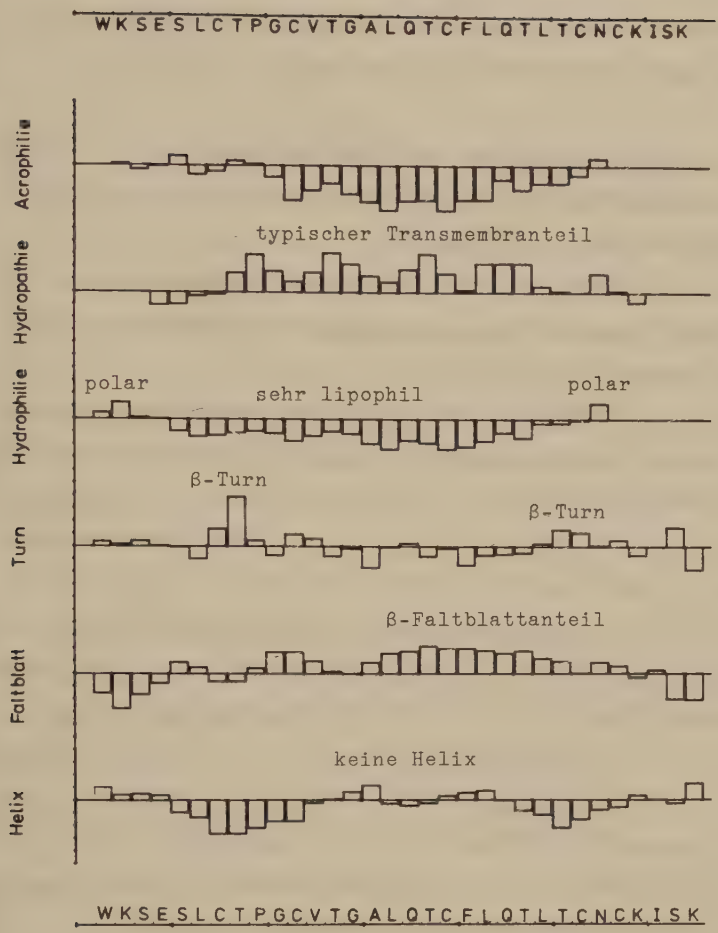


Abb. 70: Sekundärstrukturanalyse der aus dem nativen Antibiotikum abgeleiteten Vorläufersequenz von Subtilin. Trotz vieler Übereinstimmungen mit der Nisin-Sequenz weisen die Vorhersageprofile erhebliche Unterschiede in Sekundärstruktur und Eigenschaften auf (vgl. Abb. 69).

10.5. Isolierung einer Proteinfraktion mit einer dem Vorläufer ähnlichen Aminosäurenzusammensetzung

Ausgangspunkt der nachfolgend beschriebenen Suche nach Vorläufern von Epidermin war der Nachweis der ribosomalen Biosynthese des Antibiotikums. SCHNEIDER konnte durch Zugabe von Inhibitoren der Protein- oder RNA-Synthese (Erythromycin, Rifampicin) zu Kulturen von Staphylococcus epidermidis die Antibiotika-Produktion vollständig unterbinden (12).

Die Isolierung basischer Peptide aus den aufgeschlossenen Zellen einer Kultur von Staphylococcus epidermidis gelang durch Extraktion mit 0.01 N HCl. Die Ernte des Zellmaterials war mit 16 h kurz vor den Beginn der Epidermin-Produktion gelegt worden. Nach Gefriertrocknung der wässrigen Lösung wurden Aminosäuren und kleinere Peptide durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 abgetrennt. Die Aminosäurenanalyse des Totalhydrolysats der mit dem Ausschlußvolumen erscheinenden Polypeptidfraktion zeigte alle Proteinaminosäuren in sehr unterschiedlichen Konzentrationen an. Die sowohl in Epidermin als auch in den Vorläufermolekülen enthaltenen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin waren nur in Spuren vorhanden. Ihre Konzentration diente bei den nachfolgenden Reinigungsschritten als Kriterium für die Anreicherung der Vorläufer-Fraktionen.

Eine Gegenstromverteilung mit dem System 2-Butanol/1% Essigsäure konnte die durch Gelchromatographie erhaltene Polypeptidfraktion nicht weiter auftrennen, jedoch lipidisches Begleitmaterial entfernen. Erfolgreicher war eine Gegenstromverteilung mit dem System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:4). Nach 300 Verteilungsschritten

onnte eine dem Verteilungsverhalten des nativen Antibiotikums hnliche Fraktion abgetrennt werden. Ihre Aminosäurenanalyse zeigte ine Anreicherung von Phenylalanin und Tyrosin auf vergleichbare Verältnisse zu den sonstigen Aminosäuren im Totalhydrolysat an Tab. 10). Ihre Komplexizität kann erst nach elektrophoretischen ntersuchungen (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, Isoelektrische okussierung) beurteilt werden.

ie Identität mit einer Vorläufersequenz von Epidermin kann beim orliegen einer homogenen Fraktion durch tryptische Spaltung geführt erden. Das durch enzymatische Umsetzung erhaltene Partialhydrolyat kann durch Peptid-Mapping auf den Gehalt an signifikanten Bruchtücken wie z.B. das Nonapeptid 5-13 (vgl. Abb. 65) der Vorläufersequenz abgesucht werden.

ab. 10: Aminosäurenzusammensetzung des Precursors (abgeleitet aus der Struktur des nativen Antibiotikums) im Vergleich zur ASA der Craig-Fraktion 3.

minosäure	Precursor	Fraktion 3
$CysSO_3H$	-	+
Asp	1	2.56
Thr	2	1.23
Ser	3	2.10
Glu	-	6.21
Gly	2	4.20
Ala	2	2.90
Ile	2	2.01
Tyr	1	0.85
Phe	2	2.00
Lys	2	2.56
Pro	1	2.78
Cys	4	-

11. EXPERIMENTELLER TEIL

11.1. Chemikalien und Methoden

Chemikalien, Enzyme und Vergleichsverbindungen

Alle Lösungsmittel wurden, sofern nicht p.a. von der Fa. Merck bezogen, nach üblichen Methoden getrocknet und destilliert.

Die Proteasen Trypsin, α-Chymotrypsin, Pepsin, Thermolysin, Pronase und Collagenase stammten von der Fa. Calbiochem-Behring, Carboxypeptidase A,B und Y, Leucin-Aminopeptidase sowie Endoproteinase Lys-C von der Fa. Böhringer Mannheim. Die Proteasen Carboxypeptidase A,B und Leucin-Aminopeptidase waren in wässrigem Puffer gelöst. Ihre Konzentration betrug c = 5 mg/ml (Leucin-Aminopeptidase und Carboxypeptidase B) bzw. 25 mg/ml (Carboxypeptidase A). D,L-Ala-D,L-Phe stammte von der Fa. EGA-Chemie, Gly-L-Phe-L-Ala von Fluka und Gly-L-Ala-L-Phe von der Fa. Bachem. S-(2-Aminoethyl)-L-cystein wurde von der Fa. Fluka bezogen.

Puffersysteme für enzymatische Umsetzungen

A 0.05 N N-Ethylmorpholinacetat, 0.01 M $CaCl_2$ x 6 H_2O, pH 7.8

B 0.05 N N-Ethylmorpholinacetat, 0.01 M $CaCl_2$ x 6 H_2O, pH 8.0

C 0.05 N Ammoniumacetat pH 5.5

D 0.05 N Ammoniumacetat, 0.01 M $CaCl_2$ x 6 H_2O, pH 7.8

E 0.05 N Ammoniumacetat, 0.01 M $CaCl_2$ x 6 H_2O, pH 8.0

F 0.05 N Ammoniumacetat, 0.0025 M $MgCl_2$, pH 8.5

G 0.05 M Tris/HCl, 0.01 M $CaCl_2$ x 6 H_2O, pH 8.5

H 0.05 M Tris/HCl, 0.0025 M $MgCl_2$, pH 8.5

I 5 proz. wässrige Ameisensäure, pH 2.0

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (Merck). R_F-Werte wurden bei Kammersättigung und 20 °C auf Platten der Größe 20 x 10 cm bestimmt. Im allgemeinen wurden 5 µl einer 1 proz. Lösung aufgetragen. Der zerstörungsfreie Nachweis gelang bei lipophilen Peptidfragmenten durch Sprühen mit Wasser, bei Chromophore enthaltenden Peptiden im UV-Licht bei 254 nm. Als Sprühreagentien wurden Ninhydrin (21), Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylmethan (TDM)(22), Orcin/Schwefelsäure (23) und Anisaldehyd/Schwefelsäure (24) verwandt.

Fließmittelsysteme:

I	Chloroform/Methanol/17 proz. Ammoniak	(2:2:1)
II	Chloroform/Methanol/17 proz. Ammoniak	(70:35:10)
III	Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig	(65:25:4:3)
IV	n-Butanol/Eisessig/Wasser	(4:1:1)
V	n-Propanol/Wasser	(7:3)
VI	Phenol/Wasser	(3:1) (g:g)
VII	Phenol/15 proz. Ameisensäure	(3:1) (g:g)

Säulenchromatographie

Die Gelchromatographie an Sephadex LH-20, G-25 und G-15 (Deutsche Pharmacia) wurde in Säulen mit einer Mindestfüllhöhe von 90 cm und den Probemengen angepassten Durchmessern durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und Plattendiffusionstest bzw. Bioautographie.

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Zur HPLC wurden folgende Geräte der Fa. Waters eingesetzt: zwei Pumpen M 6000 A, Probenaufgeber U 6K, Gradientenprogrammer M 660. Die UV-Detektion bei λ = 210 bzw. 220 nm erfolgte durch den Spectroflow-Monitor SF 770 der Fa. Schoeffel. Für analytische Trennungen (300 x 3.9 mm) wurden Säulenmaterialien der Firmen Waters (µ Bondapak C_{18}) und Macherey & Nagel (Nucleosil 7 C_{18}) verwendet. Semipräparative Trennungen (250 x 8 mm) wurden ebenfalls an Nucleosil 7 C_{18} durchgeführt. Zur Elution dienten Acetonitril/Wasser-Systeme mit unterschiedlichen pH-Pufferzusätzen.

Gegenstromverteilung

Zur Gegenstromverteilung nach CRAIG (18) kamen Glasapparaturen der Fa. Labortec (Basel) in folgenden Größen zum Einsatz: 105 Elemente à 50 ml, 440 Elemente à 10 ml und 280 Elemente à 2 ml. Der CRAIG-Verteilung vergleichbare Ergebnisse wurden auch durch die neue Technik der Rotation Locular Countercurrent Chromatography (151) erhalten. Verwendet wurde ein RLCC-Gerät der Fa. Rikakikai (Japan).

Aminosäurenanalysen[+]

Saure Totalhydrolyse: Etwa 200 nMol Peptid bzw. Polypeptid wurden in 0.5 ml 6 N HCl gelöst und in einer zugeschmolzenen Glasampulle 18 h bei 110 °C totalhydrolysiert. Alle sauren Totalhydrolysen wurden vor Oxidation durch Zugabe von Thioglycolsäure (5 µl) geschützt. Die Reaktionslösung wurde eingedampft, in Wasser auf-

---

[+] Für die Durchführung der Analysen danke ich Frau M. Munari und Frau K. Reichle, Tübingen.

genommen und nochmals zur Trockne eingeengt.
Alkalische Totalhydrolyse (34): 1 mg Epidermin und 10 mg Bariumhydroxid wurden in 1 ml Wasser suspendiert und im Hydrolyserohr auf 125 °C erhitzt. Nach 24 h wurde mit 2 N H_2SO_4 auf pH 6 eingestellt, gefälltes Bariumsulfat abzentrifugiert und der Überstand zur Trockne eingeengt.
Oxidation von Epidermin mit Peroxyameisensäure (35): 9 ml einer 88 proz. Ameisensäurelösung wurden mit 1 ml einer 30 proz. Wasserstoffperoxidlösung versetzt und 1 h bei Raumtemperatur belassen. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde das Antibiotikum (1 mg) in 2 ml dieser Lösung aufgenommen und im Eisbad gehalten. Nach 4 h wurden 0.5 ml HBr-Lösung (33 % HBr in Eisessig) addiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde eine normale saure Totalhydrolyse durchgeführt.
Die Proben wurden in Natriumcitratpuffer pH 2.2 gelöst und ein aliquoter Teil zur Analyse auf einem Biotronik-Aminosäurenanalysator LC 6000 E (Standardprogramm) verwandt.

Gaschromatographische Konfigurationsbestimmungen[+]

Die Konfiguration der schwefelhaltigen Aminosäuren Lanthionin, 3-Methyllanthionin und S-(2-Aminoethyl)-cystein wurden durch Gaschromatographie ihrer PFP/OMe- bzw. PFP/n-Prop-Derivate bestimmt. Routineuntersuchungen erfolgten an den N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylestern der jeweiligen Hydrolysate (33).

[+] Mein herzlicher Dank gilt den Herren G.J. Nicholson, Dr. J. Gerhardt und Dr. E. Küsters für die Durchführung vieler gaschromatographischer Analysen.

Zur Methylierung wurden 0.3 mg Aminosäure bzw. Hydrolysat mit 1 ml 2 N HCl in Methanol bei 110 °C 30 min verestert. Nach Abkühlen wurde das überschüssige Reagens im N_2-Strom bei 110 °C entfernt. Die Veresterung erfolgte auf gleiche Weise mit 1 ml 4 N HCl in 1-Propanol.

Zur N-Acylierung wurde der Rückstand mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (50 µl) in Dichlormethan (500 µl) versetzt und 10 min auf 140 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Abkühlen im N_2-Strom zur Trockne gebracht, in Methylenchlorid aufgenommen und an Glaskapillaren (25-33 m) belegt mit chiraler stationärer Phase (Chirasil-Val) getrennt.

Als Gaschromatograph kamen Geräte der Fa. Carlo Erba (Fractovap 2101 bzw. 2150) mit Flammenionisationsdetektor und Wasserstoff als Trägergas zum Einsatz. Die verwendeten Temperaturprogramme sind in den Legenden der abgebildeten Chromatogramme angegeben.

Massenspektrometrie[+]

Die FD- und FAB-Massenspektren der zur Strukturaufklärung von Epidermin durch chemische oder enzymatische Umwandlungen hergestellten Fragmente wurden am Spektrometer MAT 711 (Varian), gekoppelt mit dem Datensystem SS 220, aufgenommen. FAB-Spektren wurden bei positiver Polung des Gerätes registriert. Die Ionenquellentemperatur betrug bei FD-Betrieb 60 °C, bei der FAB-Methode 30 °C. Die zu den FD-Messungen verwandten Solventien sind in den jeweiligen Legenden angegeben, beim FAB-Betrieb wurde eine

---

[+] Für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen danke ich den Herren G.J. Nicholson, H. Bartholomä und Dr. R. Müller, Tübingen.

Glycerin-Matrix verwendet.
Zur GC/MS wurde der Gaschromatograph Fractovap 2900 (Carlo Erba) mit dem Massenspektrometer MAT 112 S (Varian) kombiniert.

NMR-Spektroskopie[+]

Zur Aufnahme der Protonenresonanzspektren dienten das NMR-Spektrometer HFX 90 (90 MHz bei ^{1}H-Betrieb) und WM 400 (400 MHz). Für ^{13}C-Messungen wurden ein WP 80 (20.115 MHz) und das WM 400 (100.62 MHz) verwandt. Alle Geräte stammten von der Fa. Bruker (Karlsruhe). Die Aufnahmebedingungen sind in den Legenden der einzelnen Spektren enthalten.

IR-Spektroskopie[++]

Alle Infrarot-Spektren wurden mit KBr-Preßlingen am IR-Spektrometer 2201 der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen. Die Konzentration der Proben betrug 1.5 mg/300 mg KBr.

UV-Spektroskopie

UV-VIS-Spektrometer der Fa. Hewlett Packard. Als Lösungsmittel dienten bidestilliertes Wasser bzw. Methanol-Uvasol. Zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten wurden die Peptidkonzentrationen durch quantitative Aminosäurenanalyse ermittelt.

[+] Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich R. Brettauer, K.P. Voges, B. Maier, Dr. K. Albert, Dr. R. Müller (Tübingen) und Prof. Dr. A. Prox (Thomae, Biberach).

[++] Frau U. Förstel danke ich für die Aufnahme der IR-Spektren.

CD-Spektroskopie[+]

Dichrograph CD 185 (Roussel-Jouan). Gemessen wurde in Küvetten der Schichtdicke 0.01, 0.05 und 0.1 cm bei 23 °C. Der Gehalt an Peptid wurde mit Hilfe einer quantitativen Aminosäurenanalyse bestimmt.

11.2. Isolierung von Epidermin[++]

Im folgenden wird eine Vorschrift zur Aufarbeitung von 80 l Kulturfiltrat gegeben.

Die das Antibiotikum enthaltenden, mit konz. Ammoniak auf pH 5 eingestellten XAD-Eluat-Fraktionen (12) wurden um den Faktor 10 angereichert (Abdampfen des Lösungsmittels) und dünnschichtchromatographisch (System I) auf ihren Gehalt an Epidermin getestet. Die Fraktionen 1 (0.8 l), 2 (4.5 l) und 3 (2 l) enthielten größere Mengen an Wirkstoff, die Fraktionen 4 (2 l) und 5 (2 l) waren inaktiv. Die Epidermin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt (81.2 g). Der Rückstand wurde in Methanol/Eisessig (95:5) aufgenommen (400 ml), von unlöslichen Bestandteilen (vorwiegend Ammoniumchlorid) abzentrifugiert und in Portionen von je 50 ml

---

[+] Für die Aufnahme der CD-Spektren danke ich Frau M. Munari, Tübingen.

[++] Für die Fermentation und Bereitstellung der XAD-Eluate danke ich herzlich Frau Dr. U. Schneider und Herrn T. Hörner, Tübingen. Herr H.B. Sick (Biberach) und F. Gombert (Tübingen) halfen in dankenswerter Weise bei der Aufarbeitung größerer Mengen an Wirkstoff.

an Sephadex LH-20 (Säule 100 x 5 cm, System Methanol/Eisessig 95:5) gelchromatographiert. Positive Fraktionen (à 15 ml) wurden vereinigt und eingedampft (Gesamtausbeute 14.8 g).
Eine erste Gegenstromverteilung nach CRAIG wurde in einer 50 ml-Apparatur mit dem System 1-Butanol/Essigester/0.1 N Eisessig (3:1:3) vorgenommen. Die in der Unterphase (100 ml) gelöste Probe (5 g) wurde folgenden Trennbedingungen unterworfen:

Stufenzahl	160
Schüttelbewegungen/Stufe	70
Schüttelintensität	45
Trennzeit	20 min

Nach erfolgter Trennung konnten die epiderminhaltigen Phasen aus den Elementen 9-18 entnommen werden. Nach Eindampfen und Lyophilisation erhielt man eine Gesamtausbeute von 4.2 g.
Zur Endreinigung wurde das Rohprodukt in Portionen von je 2 g in der Unterphase des Systems 2-Butanol/0.05 N Ammoniumacetat gelöst (50 ml) und in einer 10 ml-Apparatur mit 440 Elementen aufgereinigt.

Stufenzahl	440
Schüttelbewegungen/Stufe	50
Schüttelintensität	50
Trennzeit	10 min

Die das Antibiotikum enthaltenden Elemente (170-210) wurden vereinigt, eingeengt, in Wasser aufgenommen und mehrmals am Hochvakuum lyophilisiert. Gesamtausbeute aus 80 l Kulturfiltrat: 2.6 g (30.8 mg/l). Das Antibiotikum erwies sich bei allen vorgenommenen Untersuchungen als einheitlich.

R_F(I) = 0.73, R_F(II) = 0.30, R_F(IV) = 0.05.

Aminosäurenanalyse (vgl. Abb. 2): Asp (1.00), Pro (0.95), Lan (2), 3-Me-Lan (1), Gly (2.09), Ala (2.03), Ile (2.03), Tyr (0.93), Phe (2.02), Lys (2.00).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val (vgl. Abb. 3): L-Asp (1), L-Pro (1), meso-Lan (2), 2S,3S,6R-3-Me-Lan (1), Gly (2), L-Ala (2), L-Ile (2), L-Tyr (1), L-Phe (2), L-Lys (2).

^{1}H-NMR-Spektrum: vgl. Abb. 20. ^{13}C-NMR-Spektrum: vgl. Abb.16, 57, 58, 59. UV-Spektrum: vgl. Abb. 22. IR-Spektrum: vgl. Abb. 24. CD-Spektrum: vgl. Abb. 62. HPLC: vgl. Abb. 1.

Anreicherung durch Extraktion

Alternativ zu der beschriebenen Isolierung an XAD-8 kann Epidermin wie folgt angereichert werden:

Das von Zellen und Kalk befreite Kulturfiltrat (15 l) wurde zweimal mit je 5 l 1-Butanol extrahiert, die das Antibiotikum enthaltenden organischen Phasen vereinigt und zur Trockne eingeengt (16 g). Der Rückstand wurde in Methanol (200 ml) aufgenommen und in die fünffache Menge kalten Diethylether eingerührt. Der das Antibiotikum enthaltende Niederschlag wurde abfiltriert, getrocknet (6 g) und den oben beschriebenen Reinigungsverfahren unterworfen.

11.3. Nachweis von Lanthionin, 3-Methyllanthionin und 2-Ketobuttersäure

Isolierung von Lanthionin und 3-Methyllanthionin aus dem Totalhydrolysat von Epidermin

Das saure, zur Trockne gebrachte Totalhydrolysat (6 N HCl, 18 h, 110 °C) des Antibiotikums (2 mg) wurde in Wasser (0.1 ml) aufgenommen und an Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (20 x 10 cm) mit dem System VII aufgetrennt. Die unterschiedlichen R_F-Werte der Proteinaminosäuren (0.22-0.63) im Vergleich zu den schwefelhaltigen Aminosäuren (0.11 bzw. 0.14) erlaubten das Auskratzen der Dünnschichtplatte und das Ablösen der Thioetheraminosäuren mittels Eisessig (3 x 2 ml).

Nachweis von 2-Ketobuttersäure aus dem Totalhydrolysat von Epidermin

Zu dem mit Wasser auf 1.2 ml verdünnten Totalhydrolysat des Antibiotikums (10 mg, 0.4 ml 6 N HCl, 18 h, 110 °C) wurde tropfenweise eine Lösung von 2.4-Dinitrophenylhydrazin (0.5 proz., 1.2 ml) gegeben. Zum Vergleich wurde 2-Ketobuttersäure (1 mg) unter gleichen Bedingungen (66) gefällt. Die abgetrennten und mehrmals mit Wasser gewaschenen gelben Niederschläge zeigten in allen verwendeten Dünnschichtsystemen gleiche R_F-Werte. R_F(I) = 0.85, R_F(IV) = 0.65, R_F(V) = 0.66. EI-MS: 282 M^+ (97 %), 236 (45 %), 180 (42 %), 152 (38 %), 56 (100 %).

11.4. Dansylierung von Epidermin

Eine Lösung von Epidermin (0.1 mg) in Wasser (0.1 ml) wurde mit 0.1 ml einer 0.1 M $NaHCO_3$-Lösung und 0.2 ml einer frisch hergestellten Lösung von Dansylchlorid in Aceton (2.5 mg/ml) versetzt und 15 min auf 50° C erwärmt (81). Anschließend wurde im Stickstoffstrom abgeblasen. Nach Totalhydrolyse (6 N HCl, 18 h, 110 °C) wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Aceton aufgenommen (0.1 ml) und an beidseitig beschichteten Wang-Polyamidfolien (2 µl, 5 x 5 cm, Macherey & Nagel) in beiden Dimensionen chromatographiert. Entwickelt wurde in der ersten Dimension mit Ameisensäure/Wasser (4:96), in der zweiten Dimension mit Eisessig/Toluol (20:80). Die Detektion wurde unter UV-Licht bei 254 und 366 nm vorgenommen.

Eine sichere Zuordnung gelang durch das Auftragen dansylierter Aminosäuren auf der Rückseite der Polyamidfolien. Zur Herstellung dieser dansylierten Standards wurde wie folgt verfahren: Je 0.1 ml einer Lösung der möglichen N-terminalen Aminosäure (Lys, Phe, Ile; c = 50 µg/ml) wurde mit 0.1 M $NaHCO_3$-Puffer (0.1 ml) und einer Lösung von Dansylchlorid in Aceton (2.5 mg/ml, 0.25 ml) versetzt und 30 min auf 37 °C erwärmt. Die direkt aus der Reaktionslösung auf die Folie aufgebrachten Standards (2 µl) ergaben nur im Falle von Isoleucin eine völlige Deckung der fluoreszierenden Flecken.

11.5. Analytische Spaltungen des Antibiotikums

Acidolysen

Die Spaltungen mittels Salzsäure (c = 1 mg/ml) wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 6 N HCl, 80 °C, 3h; 6 N HCl, 80 °C, 1.5 h; 0.1 N HCl, 80 °C, 3h; 10 N HCl, 37 °C, 48 h. Die Hydrolysate wurden nach Einengen und Aufnahme in wässriger Lösung durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 mit den Systemen I und IV beurteilt. Auch zeitabhängig durchgeführte Trifluoracetolysen (c = 1 mg/ml; wasserfreie TFE, 37 °C) wurden mit diesen Systemen verfolgt.

Enzymatische Fragmentierung des Gesamtmoleküls

Trypsin, α-Chymotrypsin, Thermolysin, Collagenase, Pronase: Epidermin (1 mg) wurde in Puffer A (2.5 ml) aufgenommen und mit 0.5 ml einer Pufferlösung, welche 50 µg Enzym enthielt, versetzt und auf 37 °C erwärmt. Die Umsetzung wurde in geeigneten Intervallen durch Dünnschichtchromatographie (Systeme I und IV) aliquoter Mengen der Reaktionslösung verfolgt.

Die Reaktion mit Thermolysin und Colagenase verlief auch bei verlängerter Inkubation (7 d) negativ. Trypsin zeigte nach 3 h vollständige Umsetzung. α-Chymotrypsin und Pronase ergaben nach 5 d ein ähnliches Spaltungsmuster wie Trypsin. Sowohl in der im Handel befindlichen Pronase (Mischung mehrerer Proteasen) als auch in α-Chymotrypsin (Verunreinigung) ist Trypsin enthalten. Diese Reaktionen deuteten auf eine selektive tryptische Schnittstelle in Epidermin hin.

Pepsin: Die Umsetzung des Antibiotikums (0.5 mg) in Puffer I (1 ml) mit Pepsin (50 µg) verlief negativ (T = 27 °C).
Leucin-Aminopeptidase: Das Antibiotikum (1 mg) wurde in Puffer F (2 ml) gelöst und mit 20 µl Enzymlösung versetzt. Auch nach 48 h bei 27 °C war keine Reaktion zu beobachten.
Carboxypeptidase A und B: Zu einer Lösung von Epidermin (1 mg) in Puffer B (2 ml) wurden 10 µl Carboxypeptidase A und 10 µl Carboxypeptidase B gegeben. Trotz verlängerter Inkubation (3 d bei 30 °C) waren dünnschichtchromatographisch keine Veränderungen nachweisbar.

11.6. Präparative Spaltung von Epidermin mit Trypsin

Enzym (5 mg) und Antibiotikum (100 mg) wurden mit Puffer D (250 ml) versetzt und auf 37 °C gehalten. Nach 24 h wurde mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und zur vollständigen Fällung der C-terminalen Sequenz P2 auf 0 °C abgekühlt. Der gallertartige Niederschlag des Fragments P2 wurde abzentrifugiert. Der das N-terminale Bruchstück P1 enthaltende Überstand wurde lyophilisiert und an Sephadex G-25 mit 1 proz. Eisessig gelchromatographiert (Säule 110 x 1.4 cm, 120 Tropfen/Fraktion). Die Fraktionen 16-20 enthielten die dünnschichtchromatographisch einheitliche N-terminale Sequenz 1-13 (P1) von Epidermin.
Ausbeute: 48 mg; R_F(I) = 0.60, R_F(II) = 0.21, R_F(IV) = 0.05.
Detektion: UV (-), Wasser (+), Ninhydrin (+), Chlor/TDM (+), Orcin/Schwefelsäure (-), Anisaldehyd/Schwefelsäure (-).
Aminosäurenanalyse: Pro (0.95), Gly (0.91), Ala (1.98), Ile (2.00),

Phe (0.96), Lys (2.11), Lan (1), 3-Me-Lan (1).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: L-Pro (1), meso-Lan (1), 2S,3S,6R-3-Me-Lan (1), Gly (1), L-Ala (2), L-Ile (2), L-Phe (1), L-Lys (2).

^{13}C-NMR-Spektrum: vgl. Abb. 17, 57, 58, 59. IR-Spektrum: vgl. Abb. 26. CD-Spektrum: vgl. Abb. 63. FD-MS: vgl. Abb. 27. FAB-MS: vgl. Abb. 28. HPLC: vgl. Abb. 71 .

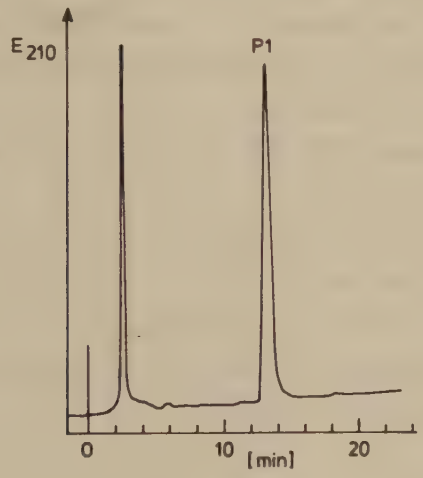


Abb. 71 : HPLC-Chromatogramm des tryptischen Fragments P1 an µ Bondapak C_{18} (300 x 3.9 mm). Mobile Phase: A = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (10:90), B = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (70:30). Linearer Gradient von 10 % B auf 70 % B in 30 min, 1.5 ml/min.

Das den C-terminalen Teil von Epidermin enthaltende Zentrifugat wurde in Dimethylformamid aufgenommen und an Sephadex LH-20 in DMF chromatographiert (Säule 120 x 1.4 cm, 80 Tropfen/Fraktion). Die in den Gläsern 26-29 zuerst eluierte Fraktion P2′war in der dünnschichtchromatographischen Analyse heterogen. Eine chemisch einheitliche Verbindung (P2) konnte in den Fraktionen 32-36 detektiert werden (vgl. Abb. 14).
Ausbeute: P2′7 mg, P2 14 mg.
Charakterisierung von P2: R_F(I) = 0.76, R_F(III) = 0.45.
Detektion: UV (+), Wasser (+), Ninhydrin (-), Chlor/TDM (+), Anisaldehyd/Schwefelsäure (+).
Aminosäurenanalyse: Asp (1.00), Gly (1.12), Tyr (0.94), Phe (1.08), Lan (1).
Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: L-Asp (1), Gly (1), meso-Lan (1), L-Tyr (1), L-Phe (1).
^{1}H-NMR-Spektrum: vgl. Abb. 21. ^{13}C-NMR-Spektrum: vgl. Abb. 18, 19, 57, 58, 59. UV-Spektrum: vgl. Abb. 23. IR-Spektrum: vgl. Abb. 25. FD-MS: vgl. Abb. 29. HPLC: vgl. Abb. 14.

11.7. Strukturaufklärung des tryptischen Fragments P1

11.7.1. Spaltung von P1 mit Carboxypeptidase B

Analytischer Ansatz: Das N-terminale Fragment P1 (1 mg) in Puffer B (2.5 ml) wurde mit einer Lösung von Carboxypeptidase B (10 µl) versetzt. Nach 3h bei 30 °C zeigte der dünnschichtchromatographische Vergleich (System I) das Auftauchen von Lysin und den vollständigen Abbau von P1 an.

Präparativer Ansatz: P1 (20 mg) in Puffer E (50 ml) wurde mit der Enzymlösung (0.1 ml) 3 h auf 32 °C erwärmt. Nach Lyophilisation wurde der Rückstand an Sephadex G-25 mit 1 proz. Essigsäure chromatographiert (Säule 110 x 1.4 cm, 100 Tropfen/Fraktion). Die Fraktionen 21-25 enthielten das dünnschichtchromatographisch reine Fragment P12.

Ausbeute: 14 mg. R_F(I) = 0.66, R_F(II) = 0.32.

Aminosäurenanalyse: Pro (0.90), Gly (0.89), Ala (2.04), Ile (2.00), Phe (0.96), Lys (0.99), Lan (1), 3-Me-Lan (1).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: L-Pro (1), meso-Lan (1), 2S,3S,6R-3-Me-Lan (1), Gly (1), L-Ala (2), L-Ile (2), L-Phe (1), L-Lys (1).

FAB-MS: vgl. Abb. 32. HPLC: vgl. Abb. 72.

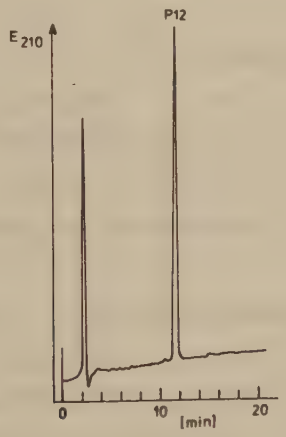


Abb. 72: HPLC-Chromatogramm von P12 an µ Bondapak C_{18} (300 x 3.9 mm). Mobile Phase: A = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (10:90), B = Acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 (70:30). Linearer Gradient von 10 % B auf 70 % B in 30 min, 1.5 ml/min.

11.7.2. Enzymatische Spaltungen des Peptids P12

Nachweis des C-terminalen Alaninrestes

0.75 mg Fragment P12 wurde in Puffer B (1.5 ml) gelöst und mit 5 µl Carboxypeptidase A versetzt. Nach 24 Stunden zeigte der dünnschichtchromatographische Vergleich (System I) das Erscheinen von Alanin an.
Die Analyse der Reaktionslösung mittels HPLC ergab vier Reaktionsprodukte, wobei nach ca. 50 proz. Abspaltung von Alanin zwei dieser Produkte aus einer Fremdproteasenaktivität stammen mußten. Dieses Gemisch konnte trotz zahlreicher Versuche zur Aufreinigung mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie nicht weiter in seine Bestandteile zerlegt werden.

Umsetzung mit Carboxypeptidase Y

Die Reaktion des Fragments P12 mit Carboxypeptidase Y (Puffer C, Enzym/Substratverhältnis 1:1, T = 25 °C) zeigte auch bei verlängerter Inkubation keinerlei Abspaltung von Alanin.

Spaltung von P12 mit Endoproteinase Lys-C

1.5 mg Endoproteinase Lys-C wurden in Puffer G (2.5 ml) gelöst, mit Peptidlösung (5 mg in 7.5 ml Puffer G) versetzt und 24 h auf 34 °C erwärmt. Nach Einstellen von pH 4 mit Eisessig wurde lyophilisiert. Die zwischen Lys^4 und Phe^5 gespaltene Sequenz P12-O konnte durch semipräparative HPLC in reiner Form isoliert

werden. Ausbeute: 2.1 mg.

$R_F(I)$ = 0.57.

Aminosäurenanalyse: Pro (0.89), Gly (1.06), Ala (2.00), Ile (1.85), Phe (0.90), Lys (1.03), Lan (1), 3-Me-Lan (1).

FAB-MS: vgl. Abb. 37.

Versuch der Abspaltung von Lysin aus P12-O

Das Fragment P12-O (1 mg) wurde in Puffer E (2 ml) aufgenommen und mit Carboxypeptidase B (20 µl) versetzt. Auch eine längere Inkubationsperiode setzte aus P12-O kein Lysin frei.

Umsetzung von P12-O mit Leucin-Aminopeptidase

Zu einer Lösung von P12-O (0.5 mg) in Puffer H (1.5 ml) wurden 20 µl Leucin-Aminopeptidase pipettiert. Nach 22 h bei 27 °C wurde auf pH 4 eingestellt. Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich in den Systemen I und III konnte die Abspaltung von Phenylalanin nachgewiesen werden.

11.7.3. EDMAN-Abbau am Peptid P12

Das Fragment P12 (1 mg) in Wasser (5 ml) wurde mit einer Lösung von Phenylisothiocyanat (0.25 ml) in 0.5 N N-Ethylmorpholin-acetat-Puffer pH 9 (4.75 ml) versetzt (47). Die Luft wurde durch Spülen mit Stickstoff verdrängt, und die Ampulle 4 h auf 40 °C erwärmt. Darauf wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in wasserfreier Trifluoressigsäure

(5 ml) gelöst, und unter Stickstoff 30 min bei 50 °C belassen. Nach Abblasen der Trifluoressigsäure wurde der Rückstand in Wasser (2 ml) aufgenommen und das entstandene Anilinothiazolinon dreimal mit n-Butylacetat (2 ml) extrahiert. Die abgespaltene Aminosäure wurde durch ihr Fehlen in der Aminosäurenanlyse des jeweils in der wässrigen Phase zurückgebliebenen Restpeptids bestimmt. Bei dem insgesamt dreistufig durchgeführten Abbau konnte nacheinander das Fehlen von Isoleucin, Alanin und meso-Lanthionin im Totalhydrolysat nachgewiesen werden.

11.7.4. Entschwefelung von P12

Das Peptid P12 (50 mg) in wässriger Lösung (50 ml) wurde mit vier Spatelspitzen des nach Literaturvorschrift (103) frisch hergestellten Katalysators versetzt und 5 h im Wasserbad bei 60 °C gerührt. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und nach Abtrennen der wässrigen Phase dreimal mit Eisessig (à 50 ml) gewaschen. Reaktionsprodukte konnten mittels DC nur im ersten Eisessigextrakt nachgewiesen werden. Dieser wurde am Hochvakuum eingedampft und der Rückstand zur Entfernung erheblicher Mengen an Nickelsalzen an Sephadex G-25 in 1 proz. Eisessig chromatographiert (Säule 110 x 1.8 cm,80 Tropfen/Glas). Die in den Fraktionen 33-41 mit Ninhydrin detektierbaren Reaktionsprodukte wurden vereinigt und lyophilisiert. Auswaage: 44 mg (enthielt noch Nickelsalze).

Im Dünnschichtchromatogramm konnten neben dem cyclischen Ausgangsprodukt P12 das erwünschte acyclische Dodekapeptid und ein weiteres Reaktionsprodukt detektiert werden. Versuche, dieses

Gemisch durch Gelchromatographie an Sephadex G-15 bzw. G-25 (1 % Eisessig) oder CRAIG-Verteilung mit den Systemen 2-Butanol/ 1 % Eisessig bzw. 2-Butanol/0.05 N Ammoniumacetat zu trennen, schlugen fehl. Der Gehalt an Ausgangsprodukt im Reaktionsgemisch konnte jedoch durch die oben erwähnte Gelchromatographie an Sephadex G-25 herabgesetzt werden, da es im Vergleich zum entschwefelten Dodekapeptid etwas retardiert wurde.
Die Reinisolierung des entschwefelten Epidermin-Fragments 1-12 gelang durch semipräparative HPLC an der Umkehrphase RP 18 (Abb. 73).

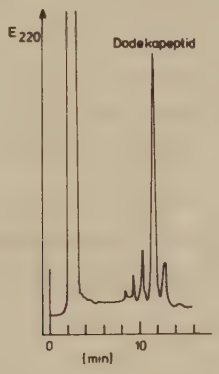


Abb. 73: Isolierung des Dodekapeptids 1-12 durch HPLC. Säule: Nucleosil 7 C_{18} (250 x 8 mm). A = Acetonitril/Wasser/ Trifluoressigsäure (10:90:0.1), B = Acetonitril/Wasser Trifluoressigsäure (70:30:0.1). Fließgeschwindigkeit 4 ml/min.

Zeit (min)	% A	% B
0	90	10
6	78	22
14	78	22
30	30	70

Nach Entfernen des Acetonitrils am Rotationsverdampfer wurde die wässrige Phase lyophilisiert. Ausbeute: 9.2 mg.

$R_F(I) = 0.69$, $R_F(II) = 0.34$.

Aminosäurenanalyse: Gly (1.15), Ala (4.67), Phe (0.85), Ile (2.00), Lys (1.13), Pro (1.07), Abu (0.98).

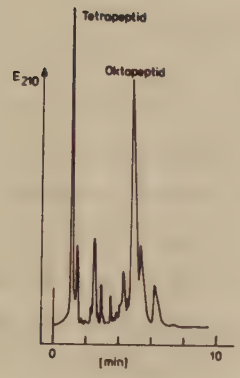
Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: Gly, L-Ala (4), D-Ala (1), L-Pro (1), L-Phe (1), L-Ile (2), L-Lys (1), D-Abu (1).

FAB-MS: vgl. Abb. 35.

Die Entschwefelung von P12 wurde insgesamt dreimal wiederholt. Es sei angemerkt, daß die obige Arbeitsvorschrift den günstigsten Verlauf aller drei Ansätze wiedergibt. Bei einer Unterdosierung von Raney-Nickel wurde nur eine partielle Umsetzung erreicht, ein Überschuß des schlecht abzumessenden Katalysators führte zu starken Chemisorptionseffekten. Auch die unterschiedliche Aktivität der subjektiv unter gleichen Bedingungen hergestellten Katalysatorchargen konnte nicht bestimmt bzw. berücksichtigt werden.

11.7.5. Tryptische Spaltung des Dodekapeptids 1-12

Das entschwefelte N-terminale Fragment 1-12 (2 mg) wurde in Puffer P (5 ml) aufgenommen und mit dem Enzym (0.1 mg) in Puffer P (0.5 ml) versetzt. Nach 3 h wurde mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und lyophilisiert. Die Aufreinigung der beiden tryptischen Spaltprodukte erfolgte durch semipräparative HPLC (Abb. 74).



Zeit (min)	% A	% B
0	90	10
4	82	18
14	82	18
30	30	70

Abb. 74: HPLC-Trennung der tryptischen Spaltung des Dodekapeptids. Säule: Nucleosil 7 C_{18} (250 x 8 mm). A = Acetonitril/ 0.1 % H_3PO_4 (10:90), B = Acetonitril/0.1 % H_3PO_4 (70:30). Fluß 4 ml/min.

Charakterisierung des Tetrapeptids 1-4: R_F(I) = 0.54, R_F(II) = 0.17.
Aminosäurenanalyse: Ala (2.17), Ile (1.00), Lys (1.08).
Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val:
L-Ile (1), L-Lys (1), L-Ala (1), D-Ala (1).
FAB-MS: 401 (M^+).
Charakterisierung des Oktapeptids 5-12: R_F(I) = 0.74, R_F(II) = 0.49.
Aminosäurenanalyse: Gly (0.87), Ala (3.00), Phe (0.93), Ile (1.04), Pro (1.12), Abu (1.08).
Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val:
Gly (1), L-Ala (3), L-Pro (1), L-Phe (1), L-Ile (1), D-Abu (1).
FAB-MS: 730 (M^+).

11.7.6. EDMAN-Abbau am entschwefelten Dodekapeptid[+]

Die N-terminale Sequenz 1-12 (4.5 nMol in 10 µl H_2O) wurde auf eine mit Polybrene getränkte Filterrondelle aufpippetiert und im Gasphasensequenator 470 A (Fa. Applied Biosystems) abgebaut. Die die PTH-Aminosäure enthaltende organische Phase wurde in einer Speed-Vac (Savant Instruments) eingedampft, in Wasser /Acetonitril (2:1) aufgenommen und ein aliquoter Teil zur HPLC-Analyse verwandt (107-109). Die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Abbaustufen sind in Abb. 75 enthalten, die aufgetragenen Probemengen und sonstige gerätespezifische Parameter befinden sich in Tab. 11.

HPLC-System: Spectra-Physics 8100 mit Integrator SP 4270. Die Detektion erfolgte bei 265 nm mit dem Spectroflow-Monitor 773 der Fa. Schoeffel. Als Säule diente eine Merck Kartusche Lichrosphere CH 8/II (250 x 4 mm), die Elution erfolgte isokratisch mit einem Gemisch aus wässrigem 0.015 M Natriumacetat-Puffer pH 5.0 (68.5 %), Acetonitril (31.5 %) und Dichlorethan (0.5 %). Die Flußrate betrug 1.5 ml/min, die Säulentemperatur 61 °C.

[+]Herrn Dr. van der Broeck (Fa. Applied Biosystems, Pfungstadt) danke ich sehr herzlich für die Durchführung des EDMAN-Abbaus.

Tab. 11: Empfindlichkeit (UV) und eingespritzte Mengen bei der HPLC-Analytik des Gasphasen-EDMAN-Abbaus (vgl. Abb. 75).

Abbauschritt	identifizierte Aminosäure	Empfindlichkeit (UV)	eingespritzt Menge/Totalvolumen (Acetonitril/Wasser)(2:1)
1	Ile	0.02	5 µl/100 µl
2	Ala	0.01	5 µl/100 µl
3	Ala	0.005	10 µl/100 µl
4	---	0.005	20 µl/100 µl
5	Phe	0.001	20 µl/100 µl
6	Ile	0.001	20 µl/ 25 µl
7	Ala	0.001	20 µl/ 25 µl
8	Abu	0.001	20 µl/ 25 µl
9	Pro	0.001	20 µl/ 25 µl
10	Gly	0.001	20 µl/ 25 µl
11	---	0.001	20 µl/ 25 µl
12	---	0.001	20 µl/ 25 µl

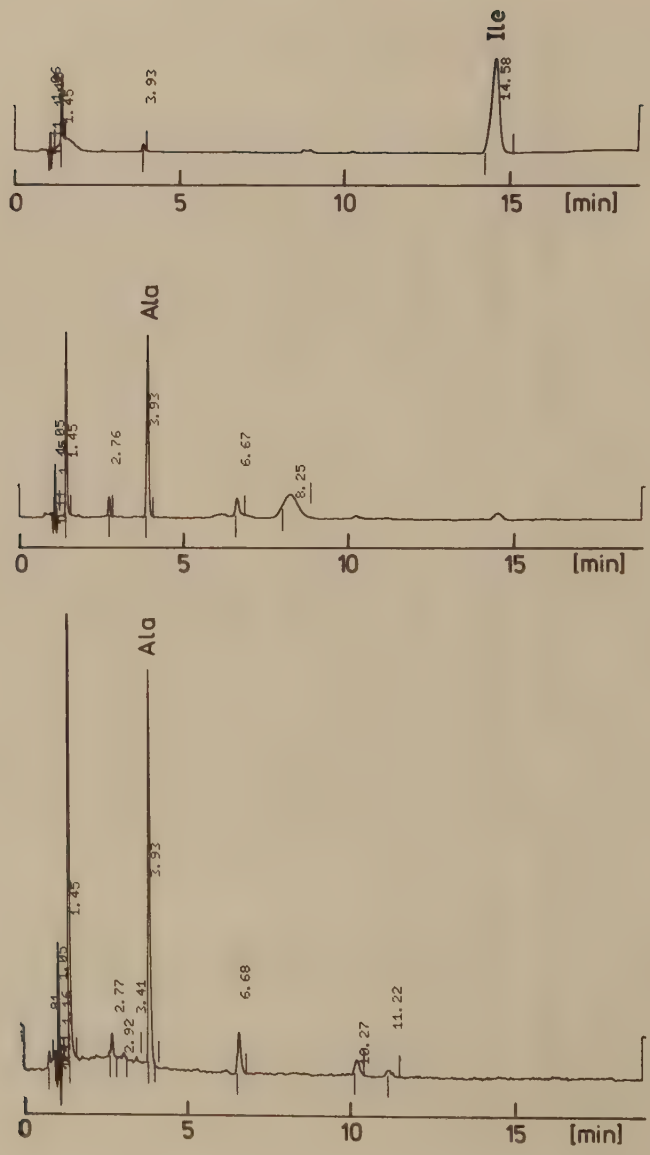


Abb. 75: HPLC-Chromatogramme der PTH-Aminosäuren des Gasphasen-EDMAN-Abbaus am Dodekapeptid (Bed. vgl. Tab. 11).

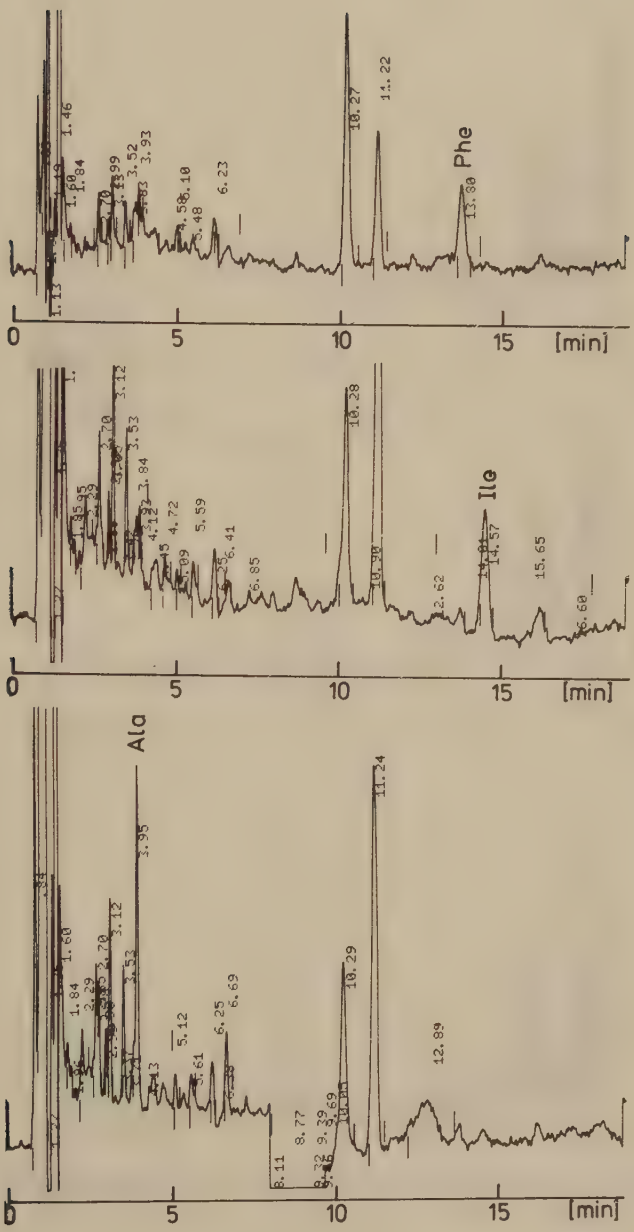


Abb. 75: Fortsetzung von S. 168.

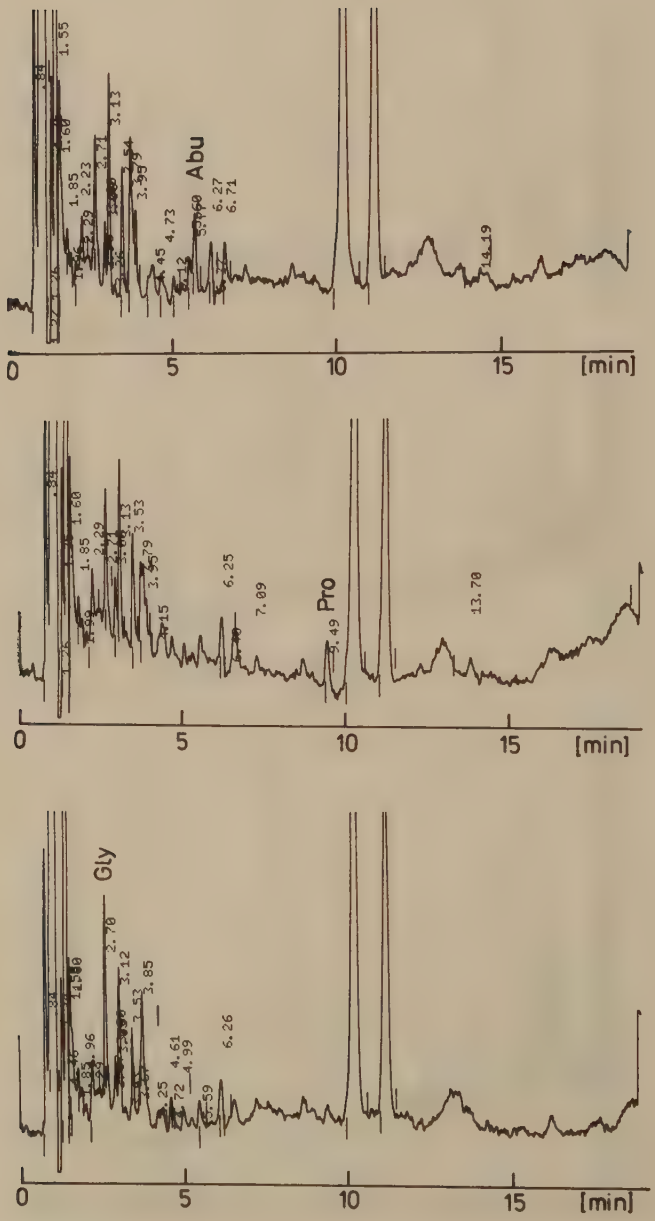


Abb. 75: Fortsetzung von S. 169.

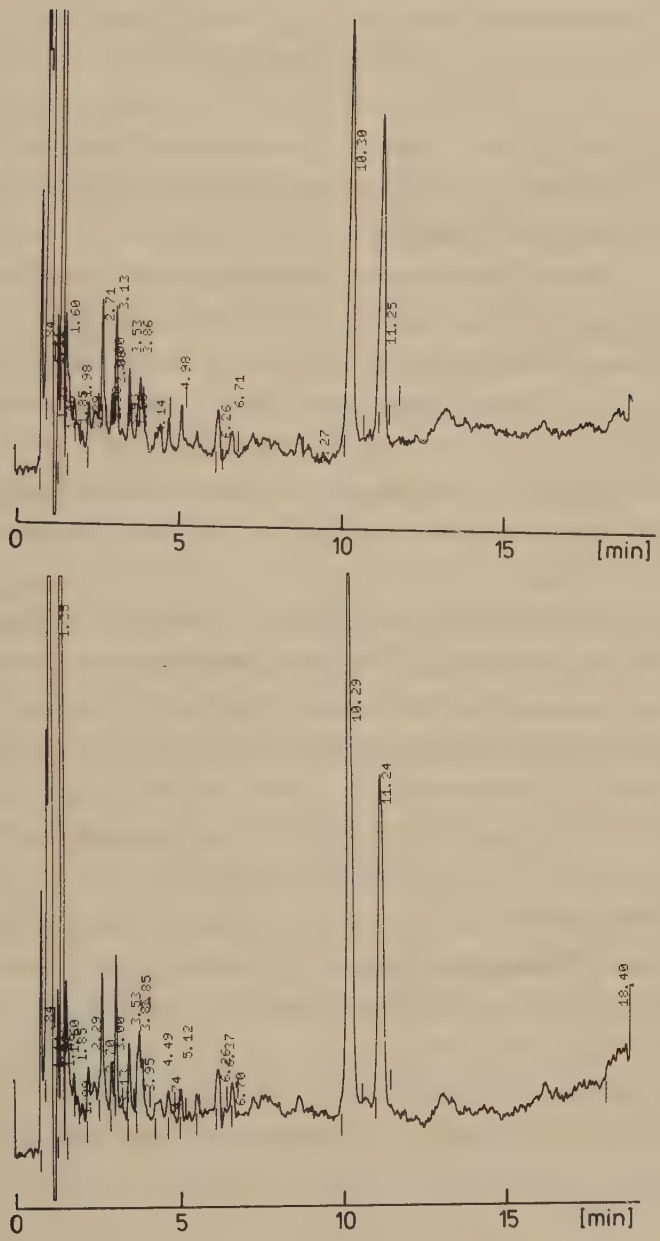


Abb. 75: Fortsetzung von S. 170.

11.8. Strukturaufklärung des tryptischen Fragments P2

11.8.1. Umsetzung von P2 mit Raney-Nickel W-2

Zu einer Lösung des C-terminalen tryptischen Fragments P2 (40 mg) in Dimethylformamid (30 ml) wurden sechs Spatelspitzen Raney-Nickel W-2 zugesetzt und 6 h auf 60 °C erwärmt. Die noch warme Lösung wurde abzentrifugiert, überstehendes DMF abgetrennt und der Katalysator zweimal mit Dimethylformamid (je 25 ml) gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt und am Hochvakuum zur Trockne eingeengt. Die Gelchromatographie an Sephadex LH-20 in Dimethylformamid (Säule 110 x 1.4 cm, 80 Tropfen/Fraktion) trennte Salze aus dem organischen Material ab. Die die Reaktionsprodukte enthaltenden Fraktionen 29-36 wurden im Hochvakuum eingeengt (Auswaage 32 mg).

Im Dünnschichtchromatogramm waren drei Reaktionsprodukte nachweisbar. Ihre Trennung gelang durch semipräparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (vgl. Abb. 39).

Das in einem zweiten Ansatz (20 mg) erhaltene Gemisch konnte auch durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 in Methanol (Säule 110 x 1.5 cm, 150 Tropfen/Fraktion) gereinigt werden. Die Fraktionen 30-37 enthielten das Peptid P21, in 40-44 war das Peptid P22 in hoher Reinheit zu detektieren.

Charakterisierung von P21: R_F(III) = 0.58, R_F(IV) = 0.47.

Aminosäurenanalyse: Asp (0.98), Gly (0.84), Ala (3.06), Tyr (0.67), Phe (1.00).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: Gly (1), L-Asp (1), D-Ala (2), L-Ala (1), L-Tyr (1), L-Phe (1).

^{1}H-NMR: vgl. Abb. 41. UV(MeOH): λ_{max} = 277 nm. FD-MS: 825 (M^+).
Charakterisierung von P22: R_F(III) = 0.62.
Aminosäurenanalyse: Asp (1.02), Gly (1.02), Ala (1.12), Tyr (0.93), Phe (1.02), meso-Lan (1).
Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val:
Gly (1), L-Asp (1), D-Ala (1), L-Tyr (1), L-Phe (1), meso-Lan (1).
UV(MeOH): λ_{max} = 277 nm. FAB-MS: 855 (M^+).
Das Verhältnis der beiden Reaktionsprodukte blieb bei den verschiedenen Ansätzen nicht konstant, es schwankte von einer 1:1-Verteilung (P21/P22) bis auf ein Verhältnis von 1:2.

11.8.2. Enzymatische Spaltungen am Fragment P21

Carboxypeptidase A

Zu einer Lösung (0.4 ml) des entschwefelten Peptids P21 (0.2 mg) in Puffer E wurden 10 µl Carboxypeptidase A pipettiert und bei 37 °C belassen. Sowohl die Dünnschichtchromatographie als auch die Analyse mittels HPLC zeigten, daß P21 durch Carboxypeptidase A nicht angegriffen wurde.

Pepsin

P21 (0.2 mg) in Puffer I (0.4 ml) wurde mit einer Lösung des Enzyms in Puffer (0.2 mg in 20 µl) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde wegen fehlender Reaktion abgebrochen.

Thermolysin

Das Peptid P21 (0.1 mg) in Puffer E (0.2 ml) wurde mit der Pufferlösung des Enzyms (0.1 mg in 10 µl) auf 37 °C erwärmt. Die Analytik

mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie sowie das Dünnschichtchromatogramm ergaben nach 24 h eine 60 proz. Umsetzung.

α-Chymotrypsin

Zu einer Lösung (0.2 ml) des Fragments P21 (0.1 mg) in Puffer D wurde Enzymlösung (0.1 mg Enzym in 10 µl Puffer) pipettiert. Die Analytik mittels DC und HPLC bewies eine vollständige Umsetzung nach 24 h.

11.8.3. Präparative Spaltungen von P21 und P22 mit α-Chymotrypsin

Umsetzung von P21

Das brückenfreie Fragment P21 (5 mg) wurde in Puffer D (10 ml) gelöst und mit 1 mg Enzym in 2 ml Puffer versetzt. Nach 24 h bei 37 °C wurde mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und lyophilisiert. Im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 42) konnten zwei Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. Das lipophile Bruchstück P21(14-20) konnte nur mittels Chlor/TDM angefärbt werden, das Fragment Ala^{21}-R auch durch Ninhydrin.

Die Isolierung der Sequenz P21(14-20) gelang durch semipräparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Abb. 76).

Charakterisierung von P21(14-20): R_F(III) = 0.37, R_F(IV) = 0.46.

Aminosäurenanalyse: Asp (1.00), Gly (0.99), Ala (1.91), Tyr (0.87), Phe (1.03).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val:

Gly (1), L-Asp (1), D-Ala (2), L-Tyr (1), L-Phe (1).

FAB-MS: 727 (M^+).

Charakterisierung von Ala^{21}-R: R_F(III) = 0.26, R_F(IV) = 0.31.

Abb. 76: Isolierung des Fragments P21(14-20) durch präp. HPLC (Nucleosil 7 C_{18}, 250 x 8 mm). A = Acetonitril/Wasser/TFA (10:90:0.1), B = (70:30:0.1), 27 % B isokratisch, 4 ml/min.

Umsetzung von P22

Die enzymatische Spaltung von P22 mit α-Chymotrypsin wurde wie für P21 beschrieben durchgeführt. Da P22 noch die intakte Schwefelbrücke aus meso-Lanthionin besaß konnte im dünnschichtchromatographischen Vergleich nur ein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Die ninhydrinpositive Sequenz P22-O wurde durch semipräparative HPLC aufgereinigt (Abb. 77).

R_F(III) = 0.27, R_F(IV) = 0.41.

Aminosäurenanalyse: Asp (1.00), Gly (0.96), Ala (0.96), Tyr (0.89), Phe (1.03), meso-Lan (1).

FAB-MS: 873 (M^+).

Abb. 77: Isolierung des Fragments P22-0 durch präp. HPLC (Nucleosil 7 C_{18}, 250 x 8 mm). A = Acetonitril/Wasser/TFA (10:90:0.1), B = (70:30:0.1), 30 % B isokratisch, 4 ml/min.

11.8.4. Abspaltung von Tyrosin aus P21(14-20)

Zu dem aus α-chymotryptischer Spaltung aus P21 erhaltenen Fragment P21(14-20) (0.2 mg) in Puffer E (0.4 ml) wurden 5 µl Carboxypeptidase A pipettiert. Nach 28 h bei 37 °C konnte mit dem System VI dünnschichtchromatographisch die Abspaltung von Tyrosin nachgewiesen werden.

11.8.5. Hydrierung von Epidermin

Das Antibiotikum (10 mg) wurde in Methanol (10 ml) in Gegenwart von 140 mg Hydrierkatalysator (10 % Pd auf Aktivkohle) bei Normaldruck und Raumtemperatur 8 h im Wasserstoffstrom hydriert.

Nach Abtrennen des Katalysators durch Zentrifugation wurde dieser mit Eisessig gewaschen (3 x mit je 10 ml), die Waschphasen vereinigt und im Hochvakuum eingeengt. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches gelang durch präparative HPLC (vgl. Abb. 44).

Charakterisierung von H1: $R_F(I) = 0.75$.

Aminosäurenanlyse: Asp (0.99), Pro (1), Lan (2), 3-Me-Lan (1), Gly (2.02), Ala (2.20), Ile (1.83), Tyr (0.76), Phe (1.91), NH_3 + 4-Thialysin (4.48), Lys (2.00).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: L-Asp (1), L-Pro (1), meso-Lan (1), 2S,3S,6R-3-Me-Lan (1), Gly (2), L-Ala (2), L-Ile (2), L-Tyr (1), L-Phe (2), S-(2-Aminoethyl)-D-cystein (1), L-Lys (2).

UV(MeOH): λ_{max} = 277 nm.

Charakterisierung von H2 (Epidermin): $R_F(I) = 0.74$.

Aminosäurenanalyse: Asp (0.98), Pro (1), Lan (2), 3-Me-Lan (1), Gly (2.24), Ala (2.04), Cys (0.98), Ile (1.86), Tyr (0.42). Phe (1.94), NH_3 (5.42), Lys (2.00).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: vgl. H1, jedoch ohne S-(2-Aminoethyl)-D-cystein.

UV(MeOH): λ_{max} = 267 nm.

Charakterisierung von H3: $R_F(I) = 0.73$.

Aminosäurenanalyse: Asp (0.97), Pro (1), Lan (2), 3-Me-Lan (1), Gly (1.90), Ala (2.31), Ile (1.82), Tyr (0.62), Phe (1.73), NH_3 + 4-Thialysin (7.71), Lys (2.00).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: vgl. H1.

UV(MeOH): λ_{max} = 277 nm.

Charakterisierung von H4: R_F(I) = 0.72.
Aminosäurenanalyse: Asp (0.94), Pro (1), Lan (2), 3-Me-Lan (1), Gly (2.27), Ala (2.00), Ile (2.07), Tyr (0.32), Phe (1.80), NH_3 (8.46), Lys (2.12).
Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: vgl. H2.
UV(MeOH): λ_{max} = 267 nm.

11.8.6. Oxidation von H3 mit Peroxyameisensäure

Wasserstoffperoxidlösung (30 proz.) (0.5 ml) wurde mit Ameisensäure (9.5 ml) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur belassen. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde H3 (0.33 mg) in Oxidationslösung (0.5 ml) aufgenommen. Nach 2 h im Eisbad wurde mit Wasser (10 ml) verdünnt und lyophilisiert. Im Aminosäurenchromatogramm eines sauren Totalhydrolysats konnte das Sulfon von S-(2-Aminoethyl)-D-cystein zwischen den Peaks von Phenylalanin und Ammoniak detektiert werden.

11.8.7. Versuch der oxidativen Abspaltung des Pyruvylrestes aus P21(14-20)

Das N-blockierte Fragment P21(14-20) (0.5 mg) wurde in 0.1 N Kalilauge (1 ml) gelöst und mit 30 proz. Wasserstoffperoxidlösung (0.1 ml) versetzt. Nach 45 min bei 37 °C wurde mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und lyophilisiert. Im Dünnschichtchromatogramm (System III und IV) konnten keine ninhydrinpositiven Reaktionsprodukte detektiert werden.

11.8.8. Acidolysen von P2, P21 und P22

Fragment P2

Das tryptische Fragment P2 wurde diversen Säurespaltungen mit 0.1 N HCl (c = 1 mg/ml) unterworfen: 80 °C, 10 h; 90 °C, 16 h und 110 °C, 16 h. Die Partialhydrolysate wurden nach Eindampfen durch Dünnschichtchromatographie im System III beurteilt. Die Detektion erfolgte durch Sprühen mit Wasser, Ninhydrin und Chlor/TDM.

Fragment P21

Die brückenfreie, N-terminal blockierte Sequenz P21 (1 mg) wurde einer Partialhydrolyse mit 0.1 N HCl bei 93 °C unterworfen. Nach 16 h wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in wässriger Lösung aufgenommen und nochmals eingedampft. Die Trennung der Fragmente D-Ala-L-Tyr-L-Ala-NHEt (19-21), D-Ala-L-Phe (16-17) und Gly-D-Ala-L-Phe (15-17) gelang durch semipräparative HPLC (vgl. Abb. 49).

Charakterisierung von D-Ala-L-Tyr-L-Ala-NHEt (19-21): R_F(III) = 0.27, R_F(IV) = 0.41.

Aminosäurenanalyse: Ala (2.00), Tyr (0.75).

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Chirasil-Val: D-Ala (1), L-Ala (1), L-Tyr (1).

FD-MS: 350 (M^+).

Charakterisierung von D-Ala-L-Phe (16-17): R_F(III) = 0.1, R_F(IV) = 0.36.

Aminosäurenanalyse: Ala (1.09), Phe (0.88).
Charakterisierung von Gly-D-Ala-L-Phe (15-17): R_F(III) = 0.09, R_F(IV) =0.30.
Aminosäurenanalyse: Gly (1.00), Ala (1.11), Phe (0.92).

Fragment P22

Das meso-Lanthionin enthaltende Fragment P22 (1 mg) wurde unter den gleichen Bedingungen wie für P21 (0.1 N HCl, 16 h, 93 °C) gespalten. Durch präparative HPLC konnte eine einheitlich erscheinende Bande abgetrennt werden (vgl. Abb. 52), deren Rechromatographie an Kieselgel 60 Dünnschichtplatten mit dem System IV zwei Peptide anzeigte (vgl. Abb. 51). Ihre Trennung gelang durch nochmalige HPLC mit verändertem Elutionspuffer (vgl. Abb. 53).
Charakterisierung von P22-1: R_F(IV) = 0.29.
Aminosäurenanalyse: meso-Lan (1), Ala (1.00), Tyr (0.67), Phe (0.99).
Charakterisierung von P22-2: R_F(IV) = 0.20.
Aminosäurenanalyse: meso-Lan (1), Gly (1.00), Ala (1.00), Tyr (0.68), Phe (0.97).

11.8.9. Endgruppenbestimmung am Dipeptid 16-17 und Tripeptid 15-17

Eine Lösung von D-Ala-L-Phe bzw. Gly-D-Ala-L-Phe (je 0.1 mg in 0.1 ml 0.05 N $NaHCO_3$-Puffer, pH 10) wurden mit 0.25 ml einer frisch bereiteten Lösung von Dansylchlorid in Aceton (1 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C aufbewahrt. Anschließend wurde eingeengt und der Rückstand einer sauren Totalhydrolyse unterworfen (6 N HCl, 18 h, 105 °C).

Nach Totalhydrolyse wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Aceton aufgenommen (50 µl) und an beidseitig beschichteten Wang-Polyamidfolien (2 µl, 5 x 5 cm, Macherey & Nagel) in beiden Dimensionen chromatographiert. Entwickelt wurde in der ersten Dimension mit Ameisensäure/Wasser (4:96), in der zweiten Dimension mit Eisessig/Toluol (20:80). Die Detektion wurde unter UV-Licht bei 254 und 366 nm vorgenommen.
Zum Vergleich wurden die synthetischen Peptide D,L-Ala-D,L-Phe und Gly-L-Ala-L-Phe unter den oben angegebenen Bedingungen dansyliert, totalhydrolysiert und auf der Rückseite der Wang-Folien chromatographiert.

11.9. Synthesen

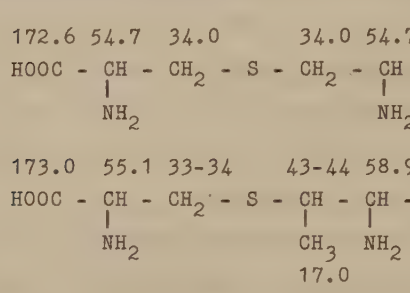
Raney-Nickel

Raney-Nickel der Aktivitätsstufe W-2 wurde nach Literaturvorschrift hergestellt (103).

Lanthionine

Meso-Lanthionin wurde in Anlehnung an die Literatur (152) synthetisiert. Die vier stereoisomeren 3-Methyllanthionine wurden nach (153,154) hergestellt. Die ^{13}C-NMR-Daten können der Tab. 12 entnommen werden.

Tab. 12: ^{13}C-NMR-Daten (ppm) von meso-Lanthionin und der stereoisomeren 3-Methyllanthionine in D_2O/DCl.



Boc-L-Ala-NHEt

Boc-L-Ala-OH (1.89 g, 10 mMol) in CH_2Cl_2 (50 ml) wurde mit Ethylamin-Hydrochlorid (1.02 g, 12.5 mMol), NMM (1.26 g, 12.5 mMol) und DCC (2.06 g, 10 mMol) versetzt und 2 h bei 0 °C belassen. Nach 12 h bei Raumtemperatur wurde von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff abgetrennt und der Überstand zur Trockne eingeengt. Nach Aufnahme in Essigester (100 ml) wurde mit 5 proz. $KHSO_4$ (20 ml), Wasser (20 ml), 5 proz. $NaHCO_3$ (20 ml) und Wasser (3 x 20 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der in erheblichen Mengen vorhandene DCH konnte durch Umkristallisation nicht vom Produkt abgetrennt werden, dies gelang erst durch Gegenstromverteilung mit dem System Chloroform/Methanol/Wasser (5:6:4). Verwendet wurde eine 10 ml-Apparatur, die Probe wurde in 20 ml Unterphase aufgetragen.

Schüttelbewegungen/Stufe	60
Schüttelintensität	60
Trennzeit	15 min

ach 215 Stufen konnte eine vollständige Trennung von DCH
Elemente 25-30) und Boc-L-Ala-NHEt (36-60) detektiert werden.
ie das Produkt enthaltenden Elemente wurden eingeengt und über
$_2O_5$ getrocknet.
usbeute: 1.2 g (55 %). R_F(IV) = 0.72, R_F(V) = 0.80.
H-NMR:(CD_3OD): δ = 1.10 (t, J = 7.2 Hz; 3H, CH_2-CH_3), 1.27 (d, J =
.3 Hz; 3H, HC-CH_3), 1.42 (s; 9 H, $C(CH_3)_3$), 3.20 (q, J = 7.2 Hz;
H, CH_2-CH_3).

CF_3COOH x H-L-Ala-NHEt

Boc-L-Ala-NHEt (1 g, 4.63 mMol) wurde mit CF_3COOH/CH_2Cl_2 (1:1)
20 ml) versetzt und nach 1 h bei Raumtemperatur zur Trockne
ingengt. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen
nd mit Ether/Petrolether (1:1) gefällt.
usbeute: 750 mg (70 %), R_F(I) = 0.85, R_F(III) = 0.21, R_F(IV) = 0.31.
H-NMR(CD_3OD): δ = 1.10 (t, J = 7.2 Hz; 3H, CH_2-CH_3), 1.35 (d, J =
.0 Hz; 3H, HC-CH_3), 3.20 (q, J = 7.2 Hz; 2H, CH_2-CH_3), 3.94
q, J = 7.0 Hz; 1H, HC-CH_3).

1.10. Isolierung einer Proteinfraktion mit einer dem Vorläufer ähnlichen Aminosäurezusammensetzung

ie Isolierung basischer Peptide aus den aufgeschlossenen Zellen
iner 16 h alten Kultur von Staphylococcus epidermidis (2 l)
elang durch Extraktion mit 0.01 N HCl[†].

---

† Für die Bereitstellung des Extraktes danke ich Frau Dr. Schneider, Tübingen.

Der durch Gefriertrocknung erhaltene Rückstand wurde an Sephadex G-25 in 1 proz. Eisessig gelchromatographiert (Säule 100 x 2 cm, 120 Tropfen/Fraktion). Höhermolekulare Verbindungen konnten in den Fraktionen 15-23 dünnschichtchromatographisch (System I) durch Sprühen mit Wasser und/oder Ninhydrin nachgewiesen werden. Die Fraktionen 33-40 enthielten unter anderem beträchtliche Mengen der freien Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure.
Ausbeute (Fraktion 15-23): 140 mg.
Aminosäurenanalyse (nMol): Asp (5.03), Thr (2.95), Ser (9.73), Glu (55.37), Gly (49.15), Ala (38.17), Val (1.74), Met (5.98), Ile (1,71), Leu (1.58), Tyr (1.20), Phe (0.59), Lys (16.53), His (0.38), Arg (1.36).
Trennung der Proteinfraktion durch Gegenstromverteilung:
Die Abtrennung lipidischer Begleitstoffe wurde durch Gegenstromverteilung in dem System 2-Butanol/1 % Essigsäure auf einer 2 ml-Apparatur erreicht.

Probenaufgabe	140 mg in 10 ml Unterphase
Schüttelbewegungen/Stufe	70
Schüttelintensität	70
Trennzeit	10 min

Nach 300 Stufen wurden die Elemente 2-30 entleert und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 100 mg.
Aminosäurenanalyse (nMol): Asp (8.74), Thr (2.90), Ser (20.42), Glu (59.92), Gly (48.59), Ala (45.28), Val (3.10), Ile (1.91), Leu (16.43), Tyr (1.03), Phe (0.82), Lys (25.37).

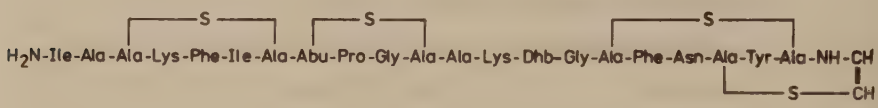
Mit dem System 1-Butanol/Wasser/Eisessig (3:4:1) konnte eine weitere Anreicherung potentieller Precursorfraktionen durch CRAIG-Gegenstromverteilung erreicht werden.

Probenaufgabe 95 mg in 12 ml Unterphase	
Schüttelbewegungen/Stufe	60
Schüttelintensität	60
Trennzeit	10 min

Nach 280 Stufen konnte wie folgt fraktioniert werden: Elemente 13-32, 33-132 und 133-212.
Ausbeuten: 13-32 41 mg, 33-132 25 mg und 133-212 8 mg.
Aminosäurenanalyse (133-212)(nMol): Cys-SO_3H, Asp (10.28), Thr (4.92), Ser (8.46), Glu (24.9), Gly (16.84), Ala (11.65), Val (5.66), Ile (8.06), Leu (6.67), Tyr (2.42), Phe (8.01) Lys (10.28).

12. ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Kulturfiltrat von Staphylococcus epidermidis konnte das heterodet cyclische Polypeptidantibiotikum Epidermin isoliert und in seiner Primärstruktur aufgeklärt werden.



Die Isolierung von Epidermin war mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, da das basische Polypeptid in neutralen und sauren Lösungen zu starken Adsorptionserscheinungen an Säulenmaterialien (Kieselgel, Sephadex G-Typen) neigte. Die Reduktion dieser Effekte durch Deprotonierung der basischen Zentren war durch die Instabilität des Antibiotikums bei hohen pH-Werten nicht angezeigt. Als erfolgreich erwies sich die Anreicherung von Epidermin aus dem Kulturfiltrat durch Extraktion bzw. Adsorption an XAD gefolgt von einer Kombination aus Gelchromatographie an Sephadex LH-20 und der Gegenstromverteilung nach CRAIG.

Die im Totalhydrolysat des Antibiotikums enthaltenen Proteinaminosäuren waren L-konfiguriert. Für ein daraus zusammengesetztes Peptidfragment läßt sich eine Molmasse von 1406 berechnen. Die Differenz von 757 Masseneinheiten auf die Molmasse von 2163 des Antibiotikums entsprach ungewöhnlichen Bausteinen, welche mit üblicher Peptidanalytik nicht erfaßt werden konnten.

Die unter den Bedingungen der sauren Totalhydrolyse stabilen Aminosäuren Lanthionin und 3-Methyllanthionin konnten über ihre Massen-

spektren identifiziert werden. Die gaschromatographische Analyse des derivatisierten Totalhydrolysats an chiraler stationärer Phase (Chirasil-Val) ergab für Lanthionin die meso- und für 3-Methyllanthionin die 2S,3S,6R-Konfiguration.
α,β-Dehydroaminobuttersäure war unter den Bedingungen der sauren Totalhydrolyse nicht stabil. Ihr Abbauprodukt, 2-Ketobuttersäure, konnte als 2,4-Dinitrophenylhydrazon nachgewiesen werden.

Die Stabilisierung des ungewöhnlichen, bislang nicht literaturbekannten Bausteins S-(2-Aminovinyl)-D-cystein gelang durch Hydrierung (Pd/C) des nativen Antibiotikums. S-(2-Aminoethyl)-D-cystein konnte über sein Massenspektrum identifiziert werden.
Die tryptische Spaltung von Epidermin lieferte zwei zur Strukturaufklärung hervorragend geeignete Fragmente.
Von dem alle basischen Funktionen des nativen Antibiotikums enthaltenden N-terminalen Bruchstück P1 (1-13) konnte zur Reduktion von Adsorptionseffekten C-terminales Lysin enzymatisch entfernt werden. Der Abbau der Schwefelbrücken im Fragment P12 (1-12) durch Desulfurierung mit Raney-Nickel ergab das brückenfreie Dodekapeptid (1-12), welches durch tryptische Spaltung in ein Tetrapeptid (1-4) und ein Oktapeptid (5-12) zerlegt wurde. Die Sequenzierung des Dodekapeptids gelang durch FAB-Massenspektrometrie. Ein zur Absicherung durchgeführter EDMAN-Abbau konnte die Sequenz 1-12 bestätigen. Die Zuordnung der Schwefelbrücken im N-terminalen Bruchstück P1 gelang durch eine Kombination von enzymatischer Analyse, EDMAN-Abbau und FAB-Massenspektrometrie.
Die Strukturaufklärung des C-terminalen tryptischen Peptids P2 war außerordentlich problematisch, da es N-terminal mit 2-Ketobuttersäure

und C-terminal durch die ε-Aminogruppe von S-(2-Aminovinyl)-D-cystein blockiert war. Die durch Desulfurierung von P2 erhaltenen Peptide P21 (brückenfrei) und P22 (enthielt meso-Lanthionin) waren nach dem Nachweis der in ihnen enthaltenen, aus S-(2-Aminovinyl)-D-cystein entstandenen Bausteine D-Alanin und Ethylamin Schlüsselpeptide für die Struktur des C-terminalen Teils von Epidermin.

Die Sequenzierung gelang durch eine Kombination von enzymatischen Spaltungen, Acidolysen sowie FAB-Massenspektrometrie am Fragment P21. Die in P2 enthaltenen Schwefelbrücken konnten durch Acidolysen am Fragment P22 zugeordnet werden.

Das native Antibiotikum sowie die zur Strukturaufklärung dargestellten Folgeprodukte wurden abhängig von den vorhandenen Probemengen mit allen modernen spektroskopischen und chemischen Verfahren charakterisiert.

Die CD-Spektren von Nisin und Epidermin wiesen beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Abhängigkeit ihrer Backbone-Konformation von Solvenseinflüßen auf.

In einem abschließenden Abschnitt wurden Möglichkeiten und Wege aufgezeigt, Vorläufersequenzen (Precursor) des ribosomal synthetisierten Antibiotikums zu isolieren.

13. LITERATURVERZEICHNIS

(1) G. Plewig und K. Kligmann, Acne, Springer, Berlin 1975.

(2) H. Schell, Therapiewoche 34, 338 (1984).

(3) G. Plewig in Fortschr. prakt. Derm. Vener., Bd. 8, S. 279, Springer, Berlin 1976.

(4) W.J. Cunliffe und S. Shuster, Lancet I, 685 (1969).

(5) A.M. Kligman, J.E. Fulton und G. Plewig, Arch. Derm. 99, 469 (1969).

(6) H.-O. Zaun in Fortschr. prakt. Derm. Vener., Bd. 9, S. 371, Springer, Berlin 1979.

(7) G. Plewig, H. Gollnick, W. Meigel und H. Wokalek, Hautarzt 32, 634 (1981).

(8) M. Gloor, M. Kionke und H.C. Friederich, Arch. Derm. Forsch. 243, 335 (1972).

(9) G.S. Hassing, J. invest. Derm. 56, 192 (1971).

(10) J.E. Fulton und G. Pablo, Arch. Derm. 110, 83 (1974).

(11) L.E. Becker, P.R. Bergstrasser, D.A. Whiting und W.E. Clendenning, Arch. Derm. 117, 482 (1981).

(12) U. Schneider, Dissertation, Universität Tübingen 1985.

(13) T. Hörner, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1984.

(14) F.J. Wolf, Separation Methods in Organic Chemistry and Biochemistry, Academic Press, 1969.

(15) R. Reiner, Antibiotica, Thieme, Stuttgart 1974.

(16) E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer, Heidelberg 1967.

(17) C. Wasternack, Pharmazie 27, 67 (1972).

(18) L.C. Craig, J. Biol. Chem. 150, 33 (1943).

(19) F.A. v. Metzsch, Angew. Chem. 65, 586 (1953).

(20) F.A. v. Metzsch, Angew. Chem. 68, 323 (1956).

(21) G. Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, De Gruyter & Co., Berlin 1966.

(22) E. v. Arx, M. Fampel und M. Brugger, J. Chromatogr. 120, 224 (1976).

(23) K.U. Lefèvre und B. Tollens, Chemische Berichte 40, 4513 (1907).

(24) E. Stahl und U. Kaltenbach, J. Chromatogr. 5, 351 (1961).

(25) G.L. Ellman, Archiv. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).

(26) H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer, Berlin 1975.

(27) Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, W.S. Hancock (Ed.), CRC Press, Boca Raton 1984.

(28) K.J. Wilson, A. Honegger, R.P. Stötzel und G.J. Hughes, Biochem J. 199, 31 (1981).

(29) W.C. Mahoney und M.A. Hermodson, J. Biol. Chem. 255, 11199 (1980).

(30) K.J. Wilson, A. Honegger und G.J. Hughes, Biochem J. 199, 43 (1981).

(31) H. Matsubara und R.M. Sasaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175 (1969).

(32) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977).

(33) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. 146, 197, (1978).

(34) H. Iwasaki, S. Horii, M. Asai, K. Mizuno, J. Ueyanagi und A. Migake, Chem. Pharm. Bull. 21, 1184 (1973).

(35) S. Moore, J. Biol. Chem. 238, 235 (1963).

(36) G.J. Nicholson, persönliche Mitteilung.

(37) N.J. Berridge, G.G.F. Newton und E.P. Abraham, Biochem J. 52, 529 (1952).

(38) E. Gross und J.L. Morell, FEBS Lett. 2, 61 (1968).

(39) G. Alderton und H.L. Fevold, J. Am. Chem. Soc. 73, 463 (1951).

(40) G. Alderton, J. Am. Chem. Soc. 75, 2391 (1953).

(41) W. Dwonch, O.L. Shotwell, R.G. Benedict, T.G. Pridham und L.A. Lindenfelser, Antibiotics and Chemotherapy 4, 1135 (1954).

(42) O.L. Shotwell, F.H. Stodola, W.R. Michael, L.A. Lindenfelser, R.G. Dworschack und T.G. Pridham, J. Am. Chem. Soc. 80, 3912 (1958).

(43) E. Gross und J.L. Morell, J. Am. Chem. Soc. 92, 2919 (1970).

(44) E. Gross und J.L. Morell, J. Am. Chem. Soc. 89, 2791 (1967).

(45) E. Gross und J.L. Morell, J. Am. Chem. Soc. 93, 4634 (1971).

(46) E. Gross, H.H. Kiltz und L.C. Craig, Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 799 (1973).

(47) H.H. Kiltz und E. Gross, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 802 (1973).

(48) H.H. Kiltz und E. Gross, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 805 (1973).

(49) E. Nebelin und E. Gross, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 807 (1973).

(50) E. Gross, H.H. Kiltz und E. Nebelin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 810 (1973).

(51) E. Gross und H.H. Kiltz, Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 559 (1973).

(52) E. Gross, J.L. Morell und L.C. Craig, Biochemistry 62, 952 (1969).

(53) E. Gross, Adv. Exp. Med. Biol. 86 B, 131 (1977).

(54) J.L. Morell und E. Gross, J. Am. Chem. Soc. 95, 6480 (1973).

(55) J.R. Knox und P.C. Keck, Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 567 (1973).

(56) J.R. Knox und P.C. Keck, Acta Crystallogr. B 31, 2698 (1975).

(57) T. Wakamiya, K. Shimbo, T. Shiba, K. Nakajima, M. Neya und K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Jpn. 55, 3878 (1982).

(58) T. Wakamiya, K. Fukase, K. Shimbo und T. Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn. 56, 1559 (1983).

(59) E. Küsters, Dissertation, Universität Tübingen 1983.

(60) G.J. Nicholson, persönliche Mitteilung.

(61) E. Küsters, H. Allgaier, G. Jung und E. Bayer, Chromatographia 18, 287 (1984).

(62) U. Schmidt, J. Häusler, E. Öhler und H. Poisel, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 37, 251 (1979).

(63) K. Noda, Y. Shimohigashi und N. Izumiya in The Peptides, E. Gross und J. Meienhofer (Eds.), Vol. 5, Academic Press, New York 1983.

(64) G.H. Fisher, P. Berryer, J.W. Ryan, V. Chauhan und C.H. Stammer, Arch. Biochem. Biophys. 211, 269 (1981).

(65) R. Lupp, Dissertation, Universität Tübingen 1983.

(66) I. Muramatsu und M. Bodansky, J. Antibiotics 21, 68 (1968).

(67) F. Lottspeich, A. Henschen und K.-P. Hupe, High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry, Walter de Gruyter, Berlin 1981.

(68) L.F. Lloyd und P.H. Corran, J. Chromatogr. 240, 445 (1982).

(69) S.B. Needleman, Protein Sequence Determination, 2. Aufl., Springer, Berlin 1975.

(70) F.S. Esch, Anal. Biochem. 136, 39 (1984).

(71) F. Weygand, A. Prox, H.H. Fessel und K.K. Sun, Z. Naturforsch. 20 b, 1169 (1965).

(72) E. Bayer, G. Jung und W. König, Z. Naturforsch. 22 b, 924 (1967).

(73) W. König, Dissertation, Universität Tübingen 1968.

(74) M. Aydin, D.H. Bloss, W.A. König, H. Brückner und G. Jung, Biomed. Mass Spectrom. 9, 39 (1982).

(75) H. Brückner, W.A. König, M. Greiner und G. Jung, Angew. Chem. 91, 508 (1979).

(76) W.A. König und M. Aydin in Peptides 1980, Proc. 16 th Eur. Pept. Symp. (K. Brunfeldt Ed.) S. 711, Scriptor, Copenhagen 1981.

(77) E. Katz, M. Aydin, W.A. König, T. Ooka und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1985, im Druck.

(78) W.A. König, persönliche Mitteilung.

(79) A. Kern, U. Kabatek, G. Jung, R.G. Werner, M. Poetsch und H. Zähner, Liebigs Ann. Chem. 1985, im Druck.

(80) Y. Narahashi in Methods in Enzymology XIX (Ed. G.E. Perlman und L. Lorand), S. 651, Academic Press, New York und London 1970.

(81) H. Laatsch, J. Chromatogr. 173, 398 (1979).

(82) M. Rinken, W.D. Lehmann und W.A. König, Liebigs Ann. Chem. 1984, 1672 (1984).

(83) K. Schlögl, F. Wessely und E. Wawersich, Monatsh. Chem. 84, 705 (1953).

(84) G. Winkelmann, H. Allgaier, R. Lupp und G. Jung, J. Antibiot. 36, 1451 (1983).

(85) H. Allgaier, G. Winkelmann und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1984, 854.

(86) M. Bodansky, J. Izdebski und I. Muramatsu, J. Am. Chem. Soc. 91, 2351 (1969).

(87) D.H. Williams und I. Fleming, Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart 1975.

(88) J. Marchand, M. Pais, X. Monseur und F.X. Jarreau, Tetrahedron 25, 937 (1969).

(89) M. Przybylski, Z. Anal. Chem. 315, 402 (1983).

(90) K.L. Rinehart, J.C.Cook, R.C. Pandey, L.A. Gaudioso, H. Meng, M.L. Moore, J.B. Gloer, G.R. Wilson, R.E. Gutowsky, P.D. Zierath, L.S. Shield, L.H. Li, H.E. Renis, J.P. McGovren und P.G. Canonico, Pure Appl. Chem. 54, 2409 (1982).

(91) D.H. Williams, C.V. Bradley, S. Santikarn und G. Bojesen, Biochem J. 201, 105 (1982).

(92) K.L. Rinehart, Science 218, 254 (1982).

(93) G.W. Taylor, M. Panico, H.R. Morris, E.A. Eady und K.T. Holland, Int. J. Mass Spectrom. and Ion Physics 48, 161 (1983).

(94) E.A. Eady, K.T. Holland und W.J. Cunliffe, J. Applied Bacteriol. 55, 461 (1983).

(95) H. Nau, H.-J. Förster, J.A. Kelley und K. Biemann, Biomed. Mass Spectrom. 2, 313 (1975).

(96) R. Shipolini, A.F. Bradbury, G.L. Callewaert und C.A. Vernon, Chem. Commun. 1967, 679.

(97) P. Haux, H. Sawerthal und E. Habermann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 737 (1967).

(98) P. Haux, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 536 (1969).

(99) P. Hartter und U. Weber, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem 356, 693 (1975).

(100) R.A. Shipolini und C.A. Vernon, Nature (London) 245, 163 (1973).

(101) M.T. Perlstein, M.Z. Atassi und S.H. Cheng, Biochim. Biophys. Acta 236, 174 (1971).

(102) H.R. Billica und H. Adkins, Org. React. Collec. Vol. 3, 176 (1955).

(103) R. Mozingo, Org. Synth. 21, 15 (1941).

(104) N.D. Johnson, M.W. Hunkapiller und L.E. Hood, Anal. Chem. 100, 335 (1978).

(105) W. Machleidt und E. Wachter in Methods in Enzymology, Vol. XLVII, C.H.W. Hirs (Ed.), Academic Press, New York 1977.

(106) E. Wachter und R. Werhahn, Anal. Chem. 97, 56 (1979).

(107) M.W. Hunkapiller und L.E. Hood, Biochemistry 17, 2124 (1978).

(108) R.M. Hewick, M.W. Hunkapiller, L.E. Hood und W.J. Dreye, J. Biol. Chem. 256, 7990 (1981).

(109) F. Lottspeich, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829 (1980).

(110) K.A. Wilson und M. Laskowski, J. Biol. Chem. 246, 3555 (1971).

(111) K. Ozawa und M. Laskowski, J. Biol. Chem. 241, 3955 (1966).

(112) M. Aydin, Dissertation, Universität Hamburg 1983.

(113) D. Cavallini, D.De Marco, B. Mondovi und G.F. Azzone, Experienta 11, 61 (1955).

(114) H. Linley, Aust. J. Chem. 12, 296 (1959).

(115) W.H. McGregor und F.H. Carpenter, Biochemistry 1, 53 (1962).

(116) S.M. Partridge und H.F. Davis, Nature 165, 62 (1950).

(117) W. Göhring und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1975, 1781.

(118) J. Michalewsky, T.F. Gabriel, D.P. Winter, R. Makofske, W. Danho, J. Shively, K. Biemann und J. Meienhofer, Int. J. Peptide Protein Res. 21, 93 (1983).

(119) E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C-NMR-Spectroscopy, Verlag Chemie 1974.

(120) O.W. Howarth und D.M.J. Lilley, Progress in NMR-Spectroscopy 12, 1 (1978).

(121) A. Srinivasan, R.W. Stephenson und R.K. Olsen, J. Org. Chem. 42, 2256 (1977).

(122) J.S. Rosenfield und A. Moscowitz, J. Am. Chem. Soc. 94, 4797 (1972).

(123) P. Laur, H. Häuser, J.E. Gurst und K. Mislow, J. Org. Chem. 32, 498 (1967).

(124) W. Stapleton und O.A. Weber, Int. J. Protein Res. 3, 243 (1971).

(125) G. Jung und M. Ottnad, Chem. Ztg. 98, 147 (1974).

(126) G. Jung, M. Ottnad und M. Rimpler, Eur. J. Biochem. 35, 436 (1973).

(127) B. Jarvis und J. Farr, Biochim. Biophys. Acta 227, 232 (1971).

(128) P. Reisinger, H. Seidel, H. Tschesche und W.P. Hammes, Microbiol. 127, 187 (1980).

(129) R.B. Johnson, S. Koehl, K.H. Wiesmüller, G. Jung und W.G. Bessler, Immunbiol. 165, 27 (1983).

(130) I. Ogawa, H. Ishihara und K. Shimura, FEBS Lett. 124, 197 (1981).

(131) F. Lipman, W. Gevers, H. Kleinkauf und R. Roskoski, Advances in Enzymologie 35, 64 (1971).

(132) S.G. Lee, R. Roskoski, K. Bauer und F. Lipman, Biochemistry 12, 398 (1973).

(133) H. Mohr und H. Kleinkauf, Biochim. Biophys. Acta 526, 375 (1978).

(134) J. Vater und H. Kleinkauf, Instrument und Forschung 9, 29 (1982).

(135) G. Taborsky, Adv. Protein Chem. 28, 1 (1974).

(136) P. Bornstein, Ann. Rev. Biochem. 43, 567 (1974).

(137) J. Stenflo und J.W. Suttie, Ann. Rev. Biochem. 46, 157 (1977).

(138) V. Braun, Biochim. Biophys. Acta 415, 335 (1975).

(139) A. Hurst, J. Gen. Microbiol. 44, 209 (1966).

(140) L.C. Ingram, Biochim. Biophys. Acta 184, 216 (1969).

(141) F.J. Bailey und A. Hurst, Can. J. Microbiol. 17, 61 (1971).

(142) A. Hurst,J. Gen. Microbiol. 45, 503 (1966).

(143) C. Nishio, S. Komura und K. Kurahashi, Biochem. Biophys. Res. Commun 116, 751 (1983).

(144) T.P. Hopp und K.R. Woods, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 3824 (1981).

(145) M. Levitt, J. Mol. Biol. 104, 59 (1976).

(146) T.P. Hopp und K.R. Woods, Molec. Immunol. 20, 483 (1983).

(147) J. Kyte und R.F. Doolittle, J. Mol. Biol. 157, 105 (1982).

(148) P.Y. Chou und G.D. Fasman, Adv. Enzymol. 47, 251 (1978).

(149) P.Y. Chou und G.D. Fasman, J. Mol. Biol. 74, 263 (1973).

(150) S.S. Zimmerman und H.A. Scheraga, Biopolymers 16, 811 (1977).

(151) Y. Ito und R.L. Bowman, J. Chromatogr. Sci 8, 315 (1970).

(152) Th. Wieland in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), Bd. XI/2, S.448, Thieme, Stuttgart.

(153) R. Pfleger und M.v. Strandtmann, Chem. Ber. 90, 1455 (1957).

(154) A. Schöberl und H. Gräfje, Chem. Ber. 94, 2583 (1961).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, Frau S. Kemmler-Sack, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I. P. Lorenz, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rundel, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, G. Winkelmann und W. Zeil.

Danksagung

Neben den bereits im Text erwähnten Personen möchte ich meiner Frau, Karin Allgaier, für die Hilfe bei der Anfertigung dieser Dissertation danken.
Frau Ursula Becker-Sanzenbacher danke ich für die Anfertigung vieler Zeichnungen.

LEBENSLAUF

Hermann Allgaier

12.3.1956	geboren in Göppingen als Sohn des Fleischermeisters Hermann Allgaier und seiner Gattin Karoline, geb. Bareiß
1963-1966	Besuch der Grundschule in Ludwigsburg-Eglosheim
1966-1975	Schüler am Mörike-Gymnasium Ludwigsburg
1975	Abitur
1975-1976	Auszubildender als Fleischer im elterlichen Hause
SS 1976	Immatrikulation für das Fach Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Juni 1982	mündliche Diplom-Hauptprüfung
August 1982-Februar 1983	Anfertigung der Diplomarbeit: "Iturin D, ein Peptidantibiotikum der Iturin-Gruppe mit ungewöhnlicher β-Aminofettsäurenzusammensetzung: Fermentation, Isolation, Charakterisierung und Derivatisierung" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Winkelmann und Prof. Dr. G. Jung
März 1983-Februar 1985	Durchführung der experimentellen Doktorarbeit" Isolierung und Struktur des tetracyclischen Polypeptidantibiotikums Epidermin" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen.
seit Januar 1984	Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes
25.8.1978	Heirat mit Karin Allgaier, geb. Kötzle
10.9.1983	Geburt unserer Tochter Stephanie

Druck: Buch- und Offsetdruck Kühnle GmbH
Gottlieb-Daimler-Straße 36 · 7141 Murr
Telefon (07144) 21287